

THESIS

TÜBINGEN

1967

Aus der Medizinischen Universitäts-Klinik Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Vergleichende Untersuchungen
zur Bestimmung des Cholesterins

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Manfred Beck
aus Ansbach

1967

8980

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA

Aus der Medizinischen Universitäts-Klinik Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Vergleichende Untersuchungen
zur Bestimmung des Cholesterins

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Manfred Beck
aus Ansbach

1967

Dekan: Professor Dr. W. Schneider

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Eggstein

2. Berichterstatter: Professor Dr. H.E. Bock

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Besprechung und Vergleich der Methoden	4
I. Cholesterinbestimmung nach SCHÖNHEIMER und SPERRY	4
A) Besprechung der Methode	4
B) Durchführung	6
C) Prüfung der Methode	9
1) Linearität der Farbreaktion für reines Cholesterin	9
2) Vergleich der Farbbildung von Cholesterin und von Cholesterin in Cholesterinoleat und -palmitat	10
3) Wiederholbarkeit	13
a) reines Cholesterin	
b) Cholesterin im Serum	
c) Leerwert und Empfindlichkeit	
4) Reproduzierbarkeit	15
a) reines Cholesterin	
b) Leerwert und Empfindlichkeit	
II. Cholesterinbestimmung nach SEARCY und BERGQUIST	17
A) Besprechung der Methode	17
B) Durchführung	18
C) Prüfung der Methode	20
1) Linearität der Farbreaktion für reines Cholesterin	20
2) Vergleich der Farbbildung von Cholesterin und von Cholesterin in Cholesterinoleat und -palmitat	21
3) Wiederholbarkeit	24
a) reines Cholesterin	
b) Cholesterin im Serum	
c) Leerwert und Empfindlichkeit	

	Seite
4) Reproduzierbarkeit	26
a) reines Cholesterin	
b) Leerwert und Empfindlichkeit	
III. Bestimmung des Gesamtcholesterins nach	
RICHTERICH und LAUBER	28
A) Besprechung der Methode	28
B) Durchführung	29
C) Prüfung der Methode	31
1) Linearität der Farbbildung für reines Cholesterin	31
2) Wiederholbarkeit	31
a) reines Cholesterin	
b) Cholesterin im Serum	
c) Leerwert und Empfindlichkeit	
IV. Bestimmung des freien Cholesterins nach	
HOEFLMAYR und FRIED	34
A) Besprechung der Methode	34
B) Durchführung	34
C) Prüfung der Methode	37
1) Linearität der Farbreaktion für reines Cholesterin	37
2) Wiederholbarkeit	38
a) reines Cholesterin	
b) Cholesterin im Serum	
c) Leerwert und Empfindlichkeit	
V. Vergleich der Cholesterinbestimmung nach	
SCHÖNHEIMER und SPERRY und SEARCY und BERGQUIST	40
VI. Vergleich der Gesamtcholesterinbestimmung nach	
RICHTERICH und LAUBER und SCHÖNHEIMER und SPERRY	51
VII. Vergleich der Bestimmung des freien Cholesterins nach	
SCHÖNHEIMER SPERRY und HOEFLMAYR FRIED	54

	Seite
VIII. Ergebnisse und Diskussion	57
IX. Bestimmung von Normalwerten	62
X. Zusammenfassung	69
Literaturverzeichnis	70
Lebenslauf	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153519_0048

EINLEITUNG

Cholesterin hat klinisch pathologische Bedeutung in der Diagnose verschiedener Erkrankungen. Als selbständiges Krankheitsbild ist die essentielle familiäre xanthomatöse Hypercholesterinämie zu erwähnen, deren Ätiologie noch unklar ist. Von dieser Hypercholesterinämie sind die essentielle xanthomatöse Hyperlipämie, die essentiellen Hyperlipidämien und die symptomatischen Lipidämien zu trennen. Unter Lipidämien oder besser Hyperlipidämien versteht EGGSTEIN²⁾ eine Vermehrung aller Serumlipide also der Neutralfette, der Phosphatide und des Cholesterins. Die isolierte Neutralfettvermehrung wird als Hyperlipämie, die Erhöhung von Cholesterin und Phosphatiden als Hyperlipidämie bezeichnet. Mit einer Hyperlipämie geht der kompensierte und dekomensierte Diabetes mellitus einher. Diabetische Komplikationen lassen zusätzlich Cholesterin und Phosphatide ansteigen, weisen also eine Hyperlipidämie auf, wie z.B. die Glomerulose (Kimmelstiel-Wilson). Nierenerkrankungen mit vermehrten Blutfetten sind die Nephrose, die Glomerulonephritis mit nephrotischem Einschlag und die Nierenvenenthrombose. Ausfall oder Unterfunktion der Schilddrüse zeigen vermehrtes Cholesterin und umgekehrt findet man bei der Hyperthyreose erniedrigtes Cholesterin. Bei der Pankreatitis ist das Cholesterin üblicherweise erniedrigt.

Sonst spielt die Bestimmung des Cholesterins eine gewisse Rolle bei Lebererkrankungen und bei Affektionen der Gallenwege. In den letzten Jahren hat die Cholesterinbestimmung zusätzliches Interesse gewonnen bei der Pathogenese und Epidemiologie der Atherosklerose. Cholesterin lagert sich bevorzugt in bradytrophem Gewebe ab, dazu gehört die Wand der Arterien, besonders die subintimale Schicht.

Cholesterin gehört zu den Sterinen und ist ein einwertiger Alkohol. Nach seinem Aufbau ist das Cholesterin verwandt mit den Gallensäuren, den Sexualhormonen und den Nebennierenrindenhormonen. An der Cholesterinbildung ist vorwiegend die Leber beteiligt¹⁾. Der Organismus arbeitet mit eigenem Cholesterin, es wird also auch endogenes Cholesterin in den Gefäßen abgelagert. Das freie Cholesterin dient vorwiegend als Baustoff, während der Cholesterinester die Wanderungsform darstellt. SPERRY⁹⁾ zeigte 1936, daß im normalen Serum das Verhältnis von freiem und verestertem Cholesterin relativ konstant ist. Ungefähr 25 bis

35 % des Gesamtcholesterins im Serum ist als freier Alkohol vorhanden, die übrigen 65 bis 75 % sind mit Fettsäuren verestert. Erst neuerdings wurde es technisch möglich, die Fettsäuren zu charakterisieren, welche an das zirkulierende Cholesterin gebunden sind. Der größere Teil dieser Fettsäuren ist ungesättigt. Es ist interessant, daß Cholesterinlinolat den größten Teil der Cholesterinester stellt, obgleich Linolsäure nur einen kleinen Teil der Fette in der Ernährung ausmacht⁹⁾.

Es gibt viele Methoden zur Bestimmung des Cholesterins, was zeigt, daß keine Methode ohne Nachteile ist und vollständig zu befriedigen vermag. Mangelnde Übereinstimmung der Cholesterinwerte innerhalb eines Laboratoriums und zwischen verschiedenen Laboratorien kann vielfach allein auf Grund technischer Mängel erklärt werden. SEARCY, GIDDINGS und BERGQUIST⁹⁾ berichten in einer Arbeit, wie in 6 Laboratorien an 3 verschiedenen Seren das Cholesterin bestimmt wurde und es dabei zu Unterschieden bis zu 187 mg% kam. Dabei hatte immer ein Labor die höchsten und ein anderes die niedrigsten Werte. In dieser Arbeit wird auch auf die Schwierigkeit der Standardisierung einer Methode hingewiesen und wie, je nachdem welcher Standard Verwendung fand, die Cholesterinwerte um 70 mg% differierten.

Im allgemeinen enthält die Bestimmung für Cholesterin wie z.B. die Methode nach SCHÖNHEIMER und SPERRY⁷⁾ vier verschiedene Phasen, nämlich Extraktion, Verseifung der Ester, Trennung und die abschließende Farbreaktion. Es gibt aber auch Methoden, die die Farbreaktion ohne Verseifung im Extrakt ansetzen wie z.B. die Methode nach SEARCY und BERGQUIST⁸⁾. Ohne Verseifung und ohne Extraktion arbeitet die Methode von RICHTERICH und LAUBER⁵⁾, die sich an WATSON¹²⁾ eng anlehnt. Die praktischste und nützlichste Methode für ein Routinelabor würde natürlich eine spezifische und direkte sein.

Die vier Phasen der Cholesterinbestimmung.

Extraktion:

Es ist bekannt, daß Cholesterin im Serum als Lipoprotein gebunden ist. Die organischen Lösungsmittel dienen dazu diesen Komplex zu zerschlagen. Chloroform, Alkohol-Aether, Alkohol-Aceton und Petroläther liefern ähnliche Ergebnisse. Es gibt also mehr als eine Methode für die Extraktion des Cholesterins.

Verseifung:

Bei gravimetrischen Bestimmungen war die Verseifung ein wesentlicher Bestandteil. Mit dem Aufkommen der kolorimetrischen Methoden tauchte die Alternative auf, zu verseifen oder nicht. Einige Forscher waren der Ansicht, daß erhitztes Alkali die chemische Struktur des Cholesterins verändert und außerdem zu lang-

wierig und kompliziert für Routinezwecke sei. Verseifung und darauffolgende Fällung mit Digitonin erlaubt aber die Trennung des Cholesterins von störenden Substanzen. Manche Forscher halten daher die Verseifung für unbedingt notwendig, während andere darauf verzichten.

Trennung:

Möglichkeiten zur Cholesterinisolierung stellen hauptsächlich die Säulenchromatographie oder die Fällung mit Digitonin als Cholesterindigitonid oder die Fällung als Pyridincholesterinsulfat oder Cholesterindibromid dar. Weitgehendste Anwendung findet die Fällung mit Digitonin.

Farbentwicklung:

Obwohl eine Anzahl von Farbentwicklungsmöglichkeiten angegeben wurden, war die bedeutendste Entdeckung die LIEBERMANN - BURCHARD Reaktion.

BESPRECHUNG DER ÜBERPRÜFTEN CHOLESTERINBESTIMMUNGSMETHODEN

I. Cholesterinbestimmung nach SCHÖNHEIMER und SPERRY

A) BESPRECHUNG DER METHODE

Cholesterinbestimmung in Anlehnung an SCHÖNHEIMER und SPERRY⁷⁾. Die Methode wurde so übernommen, wie sie an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen durchgeführt wird.

Diese Methode beruht auf der Fällung des Cholesterins mit Digitonin und einer Farbreaktion auf Cholesterin. Die Isolierung des Digitonins soll den Fehler vermeiden, der sich in andere Methoden durch chromogene Substanzen einschleicht. Aus einem Aethanol-Aether Extrakt wird das freie Cholesterin direkt, das Gesamtcholesterin nach vorheriger Verseifung mit KOH als Digitonid gefällt. Das Cholesterindigitonid ist unter den gegebenen Umständen vollkommen unlöslich und kann so durch Zentrifugieren isoliert werden. Im gewaschenen Niederschlag wird Cholesterin mittels der Reaktion nach LIEBERMANN-BURCHARD bestimmt. Die Farbreaktion nach LIEBERMANN-BURCHARD gibt mit freiem Cholesterin und Estercholesterin unterschiedliche Werte, weshalb eine Verseifung der Farbreaktion generell vorausgeht.

Sämtliche Schritte der Bestimmung wurden von den Autoren der Methode auf ein Optimum ausgerichtet, sei es schon in der Originalarbeit⁷⁾ oder in nachträglich erschienenen Arbeiten¹¹⁾.

Die Verseifung ist unter den Bedingungen, wie sie unten beschrieben werden vollständig, was Versuche mit verschiedenen Alkalikonzentrationen und Verseifungszeiten erbracht haben⁷⁾.

In einer Arbeit von SPERRY und WEBB¹¹⁾ wird gezeigt, welche Digitoninlösung die beste Fällung gibt, vor allem geht es darum ob man wässrige oder alkoholische Lösungen des Digitonins verwenden soll. Wässrige Lösungen waren nicht ganz befriedigend, da große Unterschiede auftraten. In der Originalmethode wurde eine

wässrige Digitoninlösung verwendet. Annehmbare Werte wurden nur erzielt, wenn die Lösung frisch zubereitet war, stehenlassen jedoch kann man sie nicht. Es ist daher die alkoholische Lösung vorzuziehen, die 50 % Alkohol enthält.

Die Zeit der Fällung wurde im Laufe der Zeit immer wieder verschieden angegeben. Es wird dabei behauptet, daß die Fällung in 1^h vollständig sei, aber schon bei der Erstveröffentlichung ⁷⁾ empfehlen SCHÖNHEIMER und SPERRY über Nacht stehen zu lassen. Später haben dann SPERRY und WEBB ¹¹⁾ zeigen können, daß die Fällung in 3^h bei 37° nicht vollständig ist.

Als Farbreaktion wird die LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion angesetzt. Sie stellt eine Mischung von Eisessig-Essigsäureanhydrid-Schwefelsäure dar. Der Mechanismus dieser Reaktion ist noch unbekannt. Es gibt aber verschiedene Faktoren von denen bekannt ist, daß sie die Farbe beeinflussen. Diese Faktoren haben ZAK und RESSLER zusammengefaßt ¹⁴⁾.

1) Zeit

Der Gipfel der Farbentwicklung bei 625 nm wächst zu einem Maximum und fällt dann ab, während der Gipfel bei 430 nm eine Konstante erreicht. Die grüne Farbe bei 625 nm wird gewöhnlich am meisten benützt, so auch in der hier angewandten Methode, wengleich andere Autoren den Gelbgipfel für verlässlicher halten.

2) Temperatur

Die Bildung der "grünen Farbe" ist eine Funktion der Temperatur.

3) Licht

Die gebildete Farbe ist lichtempfindlich und daher wird die Farbe in Dunkelheit entwickelt.

4) Verhältnis von freiem zu verestertem Cholesterin

Die Farbbildung ist für den Ester schneller als für die freie Form des Cholesterins.

5) Schwefelsäure

Freies und verestertes Cholesterin erreichen dieselbe Farbkonzentration mit Zunahme der Schwefelsäure und der Temperatur.

6) Wasserkonzentration

Wasser verhindert die Bildung der Farbe. Es muß daher überall ausgeschlossen werden.

Es gibt auch Autoren, die andere Farbreaktionen als stabiler ansehen so z.B. ZLATKIS ¹⁵⁾, der ein Eisenchloridreagenz an Stelle des Eisessig-Essigsäureanhydrid-Schwefelsäure Gemisches empfiehlt. SEARCY und BERGQUIST ⁸⁾ wiederum

greifen diese Reaktion wegen mangelnder Spezifität an. Sie behaupten, daß diese Reaktion von Eiweiß, Tryptophan, Bilirubin, Brom, Vitamin A, ungesättigten Fettsäuren, Hämoglobin und Steroiden beeinflußt werde.

B) DURCHFÜHRUNG DER METHODE

Reagentien:

- | | |
|--------------------|---|
| 1. Digitoninlösung | 1,5 g Digitonin (Merck) gelöst in
300 ml 50 %igem Aethanol. |
| 2. Kalilauge | 50 %ig, in wässrigem Methanol (1+1).
50 g KOH in rotulis werden mit Methanol-
H ₂ O (1+1) gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. |
| 3. Aceton-Aether | 1 Teil Diaethylaether auf 1 Teil Aceton
p.a. |
| 4. Aethanol-Aether | 2 Teile Aethanol 96 % plus 1 Teil
Diaethylaether |
| 5. Aceton-Alkohol | 1 Teil Aceton auf 1 Teil Aethanol |
| 6. Essigsäure | 10 vol. %ig |
| 7. Phenolphthalein | 1 % alkoholische Lösung (Merck) |
| 8. Farbreagenz | jeweils frisch ansetzen. Essigsäureanhydrid p.a.
+ konz. H ₂ SO ₄ p.a. (20+1) werden nach
Einbringen in eine Kältemischung (Eis + Was-
ser + Kochsalz) im Verhältnis 20 Teile
Essigsäureanhydrid zu 1 Teil konz. H ₂ SO ₄
vermischt. |

Durchführung:

Extraktion:

In einen 5 ml Erlenmeyerkolben gibt man

Aethanol-Aether (2+1)

etwa 3 ml

dazu tropfenweise Serum oder Plasma

0,2 ml

Umschwenken und den Extraktionsansatz im Wasserbad bei 80° zum Sieden
bringen, heiß filtrieren (Fritte G3 bis 4 Durchmesser 2 cm, Druckluft

Gw N₂-Druck), in ein 5 ml Meßkölbchen mit Schliff. Erlenmeyerkolben und

Fritte mit etwa 1 ml Aethanol-Aether 2 - 3 mal nachspülen, Meßkölbchen bis zur
Marke auffüllen (bei 20°). Danach gut umschütteln.

Ansatz für Gesamtcholesterin: (Doppelbestimmung ansetzen) Es werden Mikroreagenzgefäße verwendet, die ein Fassungsvermögen von 1,8 ml haben und aus Plastik hergestellt sind (4,0 x 1,0).

Filtrat 0,5 ml

Aethanol-Aether (2+1) 0,5 ml

50 %ige methanolische Kalilauge 1 Tropfen

Nun wird gut vermischt und 45 min in ein Wasserbad bei 40 - 50° zur Verseifung verbracht.

Danach wird 1 Tropfen 1 % alkoholische Phenolphthaleinlösung hinzugesetzt. Mit 10 % Essigsäure wird neutralisiert (Umschlagpunkt von Rotfärbung nach Farblos). Über diesen Punkt hinaus gibt man noch einen Tropfen Essigsäure hinzu, weil die Digitoninfällung im sauren Milieu günstiger verläuft.

Zum verseiften Extrakt werden

Digitoninlösung 0,5 ml zur Fällung zugesetzt. Um ganz sicher zu gehen sollte der Ansatz zur Fällung 8 - 9^h am besten also über Nacht stehen gelassen werden.

Ansatz für freies Cholesterin:

Filtrat 1,0 ml

Essigsäure 10 %ig 1 Tropfen

Digitoninlösung 0,5 ml

Nach gründlicher Durchmischung wird der Ansatz wie beim Gesamtcholesterin 8 - 9^h stehengelassen.

Testansatz:

Testlösung von 0,5 ml verseifen wie das Gesamtcholesterin und nach Fällung mit Digitonin auswaschen wie bei der Bestimmung des freien Cholesterins.

Waschprozedur:

Nach dem Stehenlassen zur Fällung werden die Ansätze mit einer Mikrozentrifuge (mdst. 12 000 U/min) zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Der zurückgebliebene Niederschlag wird nun ausgewaschen. Der Ansatz für freies Cholesterin und die Ansätze für die Testwerte mit 1,0 ml Aceton-Aether (1+1) versetzen. Der Niederschlag wird durch Einblasen der Waschflüssigkeit zum Aufwirbeln gebracht und dann zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und der Rückstand mit 1,0 ml Aether versetzt, Aufwirbelnlassen durch Einblasen, zentrifugieren, absaugen.

Ansätze für das Gesamtcholesterin nach dem Zentrifugieren mit 1,0 ml Aether versetzen, aufwirbeln, zentrifugieren und absaugen.

Die Ansätze werden nun bei 60 - 70° in Trockenschrank getrocknet. Die Trocknung erfordert mindestens 2^h, da der Niederschlag unbedingt ganz trocken sein muß.

Farbreaktion:

Der absolut trockene Niederschlag wird in 0,2 ml Eisessig gelöst. Hierfür werden die Ansätze in ein Wasserbad von 60 - 70° gestellt bis sich der Niederschlag gelöst hat. Dann abkühlen bis auf Zimmertemperatur. Zu jedem Ansatz 0,5 ml Farbreagenz zu geben. Das Reagenz muß frisch angesetzt und eiskalt sein. (Essigsäureanhydrid + konz. Schwefelsäure in einer Kältemischung).

Zur Farbentwicklung wird, gemessen von der Reagenzzugabe bis zum Photometrieren 45 min gewartet. Dazu stellt man die Ansätze ins Dunkle und schüttelt vorher und während der Entwicklung der Farbe kräftig um (Umstürzen).

Photometrieren:

Es wird das Filter J 61,5 benützt. Die Schichtdicke beträgt 1 cm. Bei diesen Versuchen fand das Photometer von Zeiss Anwendung (Elko III).

Analysen, Leer- und Testwerte jeweils gegen Wasser ablesen.

Berechnung:

Der Faktor errechnet sich aus eingesetzter Testmenge dividiert durch die entsprechende Extinktion minus Leerwert. Zur Umrechnung auf mg/100 ml Serum wird der Faktor mit 5 multipliziert und eingesetztes gamma Cholesterin mg Cholesterin gleichgesetzt. Er muß für die Berechnung des freien Cholesterins halbiert werden, da in diesem Fall die doppelte Menge an Extrakt also auch Serum zum Einsatz kommt.

Testansätze:

1. Stammlösung

100 mg Cholesterin p.a. Merck werden in 50 ml Aceton gelöst.

2. Testlösung

2,5 ml Stammlösung (5 mg Cholesterin) werden auf 50 ml Aceton-Alkohol (1 + 1) aufgefüllt.

davon werden

0,5 ml gleich 50 gamma Cholesterin mit 0,5 ml Aethanol-Aether auf 1 ml aufgefüllt und wie oben beschrieben behandelt (Doppelbestimmungen ansetzen).

Die Leerwerte werden erst zur Farbreaktion angesetzt und zwar 0,2 ml Eisessig und 0,5 ml Farbreagenz.

C. PRÜFUNG DER METHODE

1) Linearität der Farbreaktion

Aus der Testlösung wurden 0,1 bis 0,8 ml eingesetzt, was einem Cholesterin-gehalt von 10 bis 80 gamma entspricht. Es wurde jeweils eine Zehnfachbestimmung durchgeführt.

	10	20	30	40	50	60	70	80 gamma Cholest.
Ext.	47	100	152	217	272	332	369	430 x 10 ⁻³
	50	102	156	212	270	335	372	437
	55	100	154	222	267	326	377	435
	52	95	150	216	271	329	374	442
	48	99	161	213	265	320	381	440
	52	101	161	219	258	317	385	435
	46	105	156	202	254	320	381	440
	49	104	162	208	263	330	380	435
	50	100	150	203	284	323	380	435
	55	103	157	207	259	319	378	440
Σ	504	1009	1559	2119	2627	3251	3777	4369
M	50	101	156	212	263	325	378	437
σ	3,12	2,84	4,46	6,77	7,89	6,19	4,82	3,60
σ _M	0,98	0,90	1,41	2,14	2,49	1,95	1,52	1,14
VK%	6,24	2,81	2,85	3,19	2,63	1,90	1,27	0,82 %

N = Zahl der Fälle M = Mittelwert x = Einzelwert

σ = Standardabweichung der Extinktion

σ_M = Standardabweichung des Mittelwertes

VK = Variationskoeffizient in %

$$\sigma = \sqrt{\frac{(M-x_1)^2 + (M-x_2)^2 + (M-x_3)^2 + \dots}{N-1}}$$

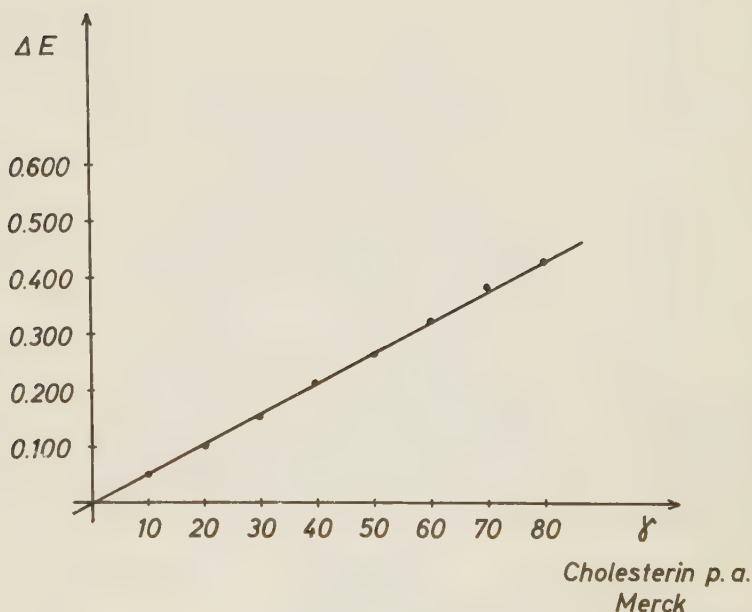
$$\sigma_M = \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$$

$$VK = \frac{\sigma \cdot 100}{M}$$

Die Praezision in der Serie wird folglich mit höheren Cholesterinkonzentrationen besser.

Abb. 1

Linearität der Farbreaktion nach
SCHÖNHEIMER SPERRY für Cholesterin p.a. Merck.



2) Vergleich der Farbbildung von Cholesterin und von Cholesterin in Cholesterinoleat und -palmitat

Es wurden je drei Einwaagen gemacht und in Aceton und Alkohol gelöst. Aus jeder dieser Lösungen wurden Mengen von 10 bis 70 γ doppelt bestimmt. Um von Cholesterinoleat auf Cholesterin zu beziehen wurde die Extinktion von Cholesterinoleat mit dem Faktor aus Molekulargewicht von Cholesterinoleat dividiert durch das Molekulargewicht von Cholesterin multipliziert, also mit 1,68. Ebenso wurde die Extinktion von Cholesterinpalmitat mit dem Molekulargewicht von Cholesterinpalmitat dividiert durch das Molekulargewicht von Cholesterin multipliziert, also

mit 1,61. Die Cholesterinester wurden käuflich erworben und in ihrer Reinheit nicht näher untersucht.

I, II, III bezeichnen die drei gemachten Einwaagen.

Cholesterin p.a. Merck

	10	20	30	40	50	60	70 gamma Chol.
Ext.	56	104	155	210	262	311	391×10^{-3}
I	65	109	160	220	265	317	389
II	67	120	181	240	276	325	399
	70	115	183	238	285	334	407
III	70	121	181	235	284	346	396
	75	122	179	240	290	348	389
M	67	115	173	231	277	330	395

Cholesterin in Cholesterinoleat

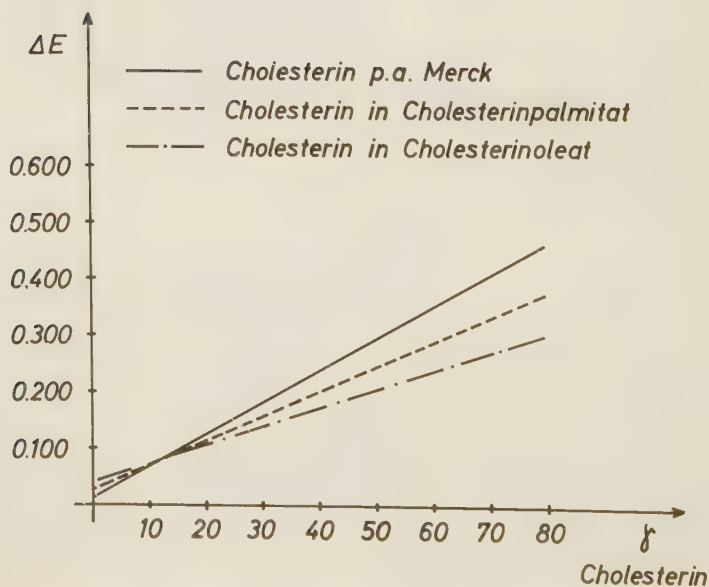
	10	20	30	40	50	60	70 gamma Chol.
Ext.	77	118	135	170	202	236	261×10^{-3}
I	87	126	136	167	210	240	271
II	82	97	123	165	200	227	278
	86	102	123	168	205	226	286
III	81	98	126	167	210	234	261
	77	108	119	168	197	232	268
M	81	108	127	167	204	232	270

Cholesterin in Cholesterinpalmitat

	10	20	30	40	50	60	70 gamma Chol.
Ext.	77	121	162	194	230	290	322 x 10 ⁻³
I	82	132	162	189	236	283	327
II	79	127	160	204	233	296	335
	84	136	170	197	246	304	346
III	79	121	162	212	244	297	319
	84	123	168	214	240	286	330
M	80	126	164	201	238	292	329

Abb. 2

Vergleich der Farbbildung nach
SCHÖNHEIMER SPERRY mit Cholesterin p.a. Merck,
Cholesterinoleat und Cholesterinpalmitat.



Die drei Geraden der obigen Zeichnung stellen Regressionsgeraden dar.

$$y = a + b \cdot x$$

a = Schnittpunkt mit der y Achse

b = Steigung der Geraden

$$b = \frac{\sum(x \cdot y) - \bar{x} \sum(y)}{\sum(x^2) - \bar{x} \sum(x)} = \operatorname{tg} \alpha$$

$$a = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$$

Cholesterin p.a. Merck

$$b = 0,55 = 29^\circ$$

$$a = 0,010$$

$$y = 0,010 + 0,0055 \cdot x$$

Cholesterin in Cholesterinoleat

$$b = 0,31 = 17^\circ$$

$$a = 0,050$$

$$y = 0,050 + 0,0031 \cdot x$$

Cholesterin in Cholesterinpalmitat

$$b = 0,41 = 22^\circ$$

$$a = 0,040$$

$$y = 0,040 + 0,0041 \cdot x$$

Die Zunahme der Farbintensität mit steigender Konzentration ist bei Cholesterin p.a. Merck am stärksten (Steigung der Regressionsgeraden = 29°). Bei Cholesterin in Cholesterinpalmitat nimmt die Farbintensität bei steigender Konzentration weniger zu (Steigung der Regressionsgeraden = 22°) und am geringsten ist die Zunahme bei Cholesterin in Cholesterinoleat (Steigung der Regressionsgeraden = 17°).

3) Wiederholbarkeit = Praezision in der Serie

a) reines Cholesterin p.a. Merck

Es wurde die Wiederholbarkeit für niedere, mittlere und höhere Konzentrationen ermittelt. Bestimmt wurde sie für 20, 40, 60, 80 gamma Cholesterin. Es wurde jeweils eine Zehnfachbestimmung durchgeführt.

	20	40	60	80 gamma Cholesterin
Extinktion	100	217	332	430×10^{-3}
	102	212	335	437
	100	222	326	435
	95	216	329	442
	99	213	320	440
	101	219	317	435
	105	202	320	440
	104	208	330	435
	100	203	323	435
	103	207	319	440
Σ	1009	2119	3251	4369
M	101	212	325	437
σ	2,84	6,77	6,19	3,60
σ_M	0,90	2,14	1,95	1,14
VK%	2,81	3,19	1,90	0,82 %

Die Praezision in der Serie nimmt also mit steigender Cholesterinkonzentration zu.

- b) Wiederholbarkeit = Praezision in der Serie für Cholesterin im Serum
In einem Serum wurden sämtliche Schritte der Bestimmung 10mal durchgeführt.

Die Werte stellen Cholesterin in mg% dar.

Gesamtcholesterin in mg%	freies Cholesterin in mg%
255	78
249	75
259	74
253	76
245	73
249	72
249	75
250	77
253	74
255	77

	Gesamtchol.	freies Cholest.
Mittelwert $\bar{x}$ in mg%	252	75
Standardabweichung σ	4,01	1,91
Standardabweichung vom Mittelwert $\bar{x}$ σ_M	1,26	0,60
Variationskoeffizient VK:	1,59 %	2,54 %

Die Praezision in der Serie für Cholesterin im Serum ist folglich für freies Cholesterin besser als für Gesamtcholesterin.

- c) Wiederholbarkeit = Praezision in der Serie für den Leerwert und Empfindlichkeit der Methode
Der Leerwert wurde 12mal bestimmt.

0, 1, 0, 1, 2, 2, 3, 2, 0, 2, 2, 1,

Mittelwert $\bar{x} = 1,33$

Standardabweichung $\sigma = 1,04$

Standardabweichung des Mittelwerts $\sigma_M = 0,30$

Die Empfindlichkeit der Methode entspricht der doppelten Standardabweichung des mittleren Leerwertes das sind hier $2,08 = 1,91$ % ist also gut.

- 4) Reproduzierbarkeit von Standardlösungen = Praezision von Tag zu Tag

- a) reines Cholesterin p.a. Merck

Die Menge von 50 gamma Cholesterin wurde über 5 Monate bestimmt.
Die Werte stellen die Extinktionen dar.

270	267	280	265	266
270	285	285	283	286
251	248	280	277	290
290	260	268	250	254
255	258	270	278	274
277	275	278		

Mittelwert der Extinktionen $\bar{x} = 271 \hat{=} 250$ mg%

Standardabweichung $\sigma = 12,37 \hat{=} 11,41$ mg%

Standardabweichung des Mittelwertes $\sigma_M = 239 \hat{=} 2,20$ mg%

Variationskoeffizient VK = 4,42 %

Die Reproduzierbarkeit = Praezision von Tag zu Tag von Standardlösungen ist gut und zeigt einen Variationskoeffizienten von 4,42 %.

b) Reproduzierbarkeit = Praezision von Tag zu Tag für den Leerwert und Empfindlichkeit der Methode

Der Leerwert wurde über 5 Monate bestimmt. Die Werte stellen die Extinktionen dar.

4, 2, 3, 2, 5, 4, 6, 4, 8, 11, 5, 3, 8, 6, 3, 10.

Mittelwert $\bar{x} = 5,25$

Standardabweichung $\sigma = 2,79$

Standardabweichung des Mittelwertes $\sigma_M = 0,72$.

Die Empfindlichkeit der Methode, das bedeutet doppelte Standardabweichung des Leerwerts beträgt hier also $5,58 \hat{=} 5,15 \text{ mg\%}$, ist also gut.

II. Cholesterinbestimmung in Anlehnung an SEARCY und BERGQUIST⁸⁾.

Die Methode wurde in dieser Arbeit auf eine Mikromethode umgestellt.

A) BESPRECHUNG DER METHODE

Bei dieser Methode wird eine orange Farbe gebildet gleichermaßen für freies und verestertes Cholesterin. Zur Bestimmung des Gesamtcholesterins ist keine Fällung notwendig. Das freie Cholesterin muß mit Digitonin zur Fällung gebracht werden.

Die entstehende Farbe wird quantitativ gemessen bei einer Wellenlänge, die wenig empfänglich ist für störende Substanzen. Das freie wie das veresterte Cholesterin ergeben einen scharfen Absorptionsgipfel zwischen 480 und 500 nm. Das Absorptionsmaximum liegt bei 490 nm. Die Digitonide des Cholesterins zeigten eine leichte Verschiebung im Spektrum. Dies erklärt sich durch die gelben Reaktionsprodukte, die sich vom Digitonin ableiten, wie SEARCY und BERGQUIST angeben⁸⁾. Als weiteres ergab sich in ihrer Arbeit, daß die maximale Farbdichte in 8 - 15 Minuten erreicht wird und stabil ist. Ein Abkühlen des Reaktionsgemisches sei nicht notwendig, da die Wärmeentwicklung der Farbe wesentlich unter der anderer Methoden liege. Die Gefahr einer Verkohlung des Cholesterins ist somit gering. Die Versuchsergebnisse von SEARCY und BERGQUIST fordern nicht die Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur während der Farbentwicklung. Die Reproduzierbarkeit erscheint nicht abhängig zu sein von der Temperatur.

ZAK und EPSTEIN¹³⁾ haben in einer kritischen Arbeit über die Methode nach SEARCY und BERGQUIST vor allem Faktoren untersucht, die das Reagenzgemisch (Eisensulfat in Eisessig) betreffen. Sie untersuchten, ob das zwei- oder dreiwertige Eisen die Reaktionsform darstellt. Es zeigte sich, daß es keine Reaktionsunterschiede zwischen beiden Lösungen gibt. Die Versuche von ZAK und EPSTEIN¹³⁾ ergaben weiter, daß das zweiwertige Eisen des Reaktionsgemisches in wenigen Tagen sehr stark abnahm und daß daher das Gemisch instabil sein müsse, sofern das Kriterium der Stabilität der Oxydationsstatus ist. Die Wahrscheinlichkeit und die gemachten Versuche legen es jedoch nahe, daß das dreiwertige Eisen die aktive Form des Reaktionsgemisches darstellt.

B) DURCHFÜHRUNG DER METHODE

Reagentien:

1) FeSO_4 Eisessigreagenz

Eine gesättigte Lösung wird hergestellt, indem man etwa 300 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck) zu 1 Liter Eisessig p.a. gibt und ein paar Minuten schüttelt und darauf mit Selecta Faltenfilter Nr. 595 1/2 filtriert. Bei Raumtemperatur ist das Reagenz über Monate stabil.

2) konz. H_2SO_4

3) Digitoninlösung

1,5 g Digitonin (Merck) werden in 300 ml 50 %igem Aethanol gelöst.

4) Essigsäure

10 vol. %ig

5) Aethanol-Aether

2 Teile Aethanol 96 % plus 1 Teil Diaethyl-aether

6) Aceton-Aether

2 Teile Aether auf 1 Teil Aceton p.a.

7) Aceton-Alkohol

1 Teil Aceton auf 1 Teil Aethanol

8) Cholesterinstandard

a) Stammlösung

100 mg Cholesterin p.a. Merck werden in 50 ml Aceton gelöst.

b) Testlösung

2,5 ml Stammlösung (5 mg Cholesterin) werden auf 50 ml Aceton-Alkohol (1+1) aufgefüllt. 0,5 ml = 50 gamma Cholesterin

Extraktion:

In ein Zentrifugenglas mit Schliff (NS 14,5 Glashöhe 11 cm, innerer Durchmesser etwa 1,5 cm) gibt man Aethanol-Aether (2+1) 5 ml

bei 20° und dazu tropfenweise Serum 0,1 ml

Das Zentrifugenglas wird mit einem Plastikstopfen verschlossen und 15 min bei hoher Drehzahl (> 2000 U/min) zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und in einem Kölbchen auf 20° in einem Wasserbad gebracht.

Ansatz für Gesamtcholesterin: (Doppelbestimmung durchführen).

Man benützt Mikroreagenzgefäße aus Plastik mit einem

Fassungsvermögen von 1,8 (4,0 x 1,0).

Aus dem Extrakt (20°) gibt man 0,5 ml

und von dem Eisensulfat-Eisessigreagenz 0,5 ml

Testansatz:

Testlösung von 0,5 ml wird mit 0,5 ml Eisensulfat-Eisessigreagenz versetzt.

Leerwert:

Aethanol-Aether (2 + 1)	0,5 ml
Eisensulfat-Eisessig	0,5 ml

Ansatz für freies Cholesterin:

Extrakt	1,0 ml
Essigsäure 10 %ig	1 Tropfen
Digitoninlösung	0,5 ml

Dieser Ansatz wird nach gründlicher Durchmischung etwa 8 - 9^h stehengelassen.

Nach der Fällung werden die Ansätze mit einer Mikrozentrifuge (mdst 1200 U/min) zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Der Niederschlag wird durch Einblasen von 1,0 ml Aceton-Aether (1 + 1) zum Aufwirbeln gebracht und zentrifugiert. Nach erneutem Absaugen wird mit 1,0 ml Aether nachgewaschen, zentrifugiert und abgesaugt.

Die Ansätze werden bei 60 - 80° in den Trockenschrank gebracht und dort etwa 2 Stunden stehengelassen, um unbedingte Trockenheit zu erreichen.

Zum trockenen Niederschlag werden 0,5 ml Eisensulfat-Eisessiglösung und 0,5 ml Aethanol-Aether zugegeben, um ihn zur Lösung zu bringen. Um diese Reaktion zu beschleunigen werden die Ansätze in ein Wasserbad von 60 - 70° gestellt. Die Zeit ergibt sich aus der Lösung der Niederschläge.

Farbreaktion:

Zur Entwicklung der Farbe gibt man 0,5 ml konz. Schwefelsäure hinzu. Die verschlossenen Zentrifugengefäße werden etwa 20 mal langsam umgestürzt und die dabei entstehende Farbe wird nach 10 min abgelesen.

Es wird das Filter S 49E des Zeiss Photometers (Elko III) benützt, was einer Wellenlänge von 490 m μ entspricht. Die Schichtdicke beträgt 1 cm. Analysen, Leerwert und Testwert werden jeweils gegen Wasser abgelesen.

Berechnung:

Der Faktor errechnet sich aus eingesetzter Testmenge dividiert durch die entsprechende Extinktion minus Leerwert. Zur Umrechnung auf mg/100 ml Serum wird der Faktor mit 10 multipliziert und eingesetztes gamma Cholesterin mg Cholesterin gleichgesetzt. Für die Berechnung des freien Cholesterin wird der Faktor halbiert, da die doppelte Menge Extrakt angesetzt wurde.

C) PRÜFUNG DER METHODE

1) Linearität der Farbreaktion

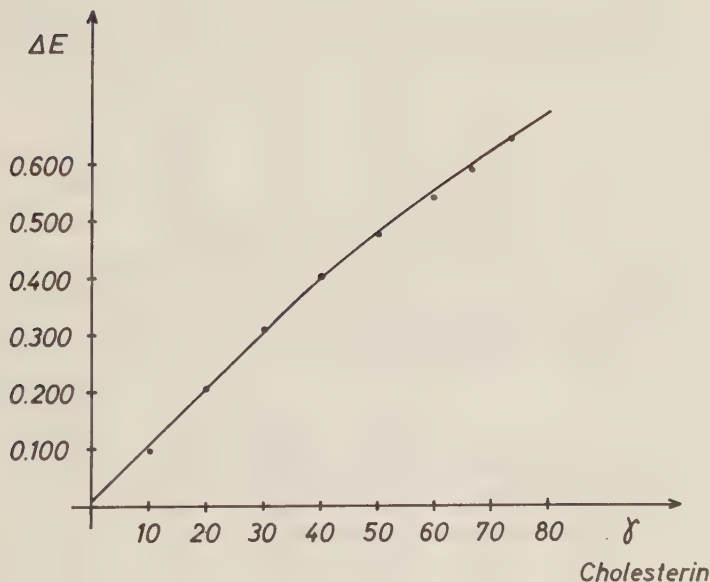
Aus der Testlösung wurden 0,1 bis 0,8 ml eingesetzt, was einem Cholesterin-gehalt von 10 bis 80 gamma entspricht. Es wurde jeweils eine Zehnfachbestim-mung durchgeführt.

	10	20	30	40	50	60	70	80 gamma Cholest.
Ext.	99	201	311	401	487	543	600	650 x 10 ⁻³
	94	200	310	401	480	544	599	649
	97	205	309	399	489	542	599	650
	97	199	305	396	486	547	593	641
	98	201	309	402	487	543	594	643
	96	197	305	403	482	546	593	640
	94	199	301	408	481	544	594	645
	97	198	306	400	486	541	600	654
	95	203	308	401	487	542	596	644
	96	200	309	404	483	545	595	646
Σ	963	2003	3073	4015	4848	5437	5963	6462
$\bar{x}$	96	200	307	402	485	544	596	646
σ	1,66	2,38	3,03	3,12	3,05	2,02	2,92	4,34
σ_M	0,52	0,75	0,96	0,98	0,96	0,64	0,92	1,37
VK%	1,72	1,19	0,98	0,77	0,62	0,37	0,53	0,67 %

Die Praezision in der Serie wird mit steigender Cholesterinkonzentration bis zu einer Cholesterinmenge von 60 γ besser, um bei noch größerer Konzentration schlechter zu werden.

Abb. 3

Linearität der Farbreaktion nach
SEARCY BERGQUIST für Cholesterin p.a. Merck.



2) Vergleich der Farbbildung von Cholesterin und von Cholesterin in Cholesterinoleat und -palmitat

Es wurden je drei Einwaagen gemacht und in Aceton und Alkohol gelöst. Aus jeder dieser Lösungen wurden Mengen von 10 bis 70 γ doppelt bestimmt. Um von Cholesterinoleat auf Cholesterin zu beziehen wurde die Extinktion von Cholesterinoleat mit dem Faktor aus Molekulargewicht von Cholesterinoleat dividiert durch das Molekulargewicht von Cholesterin multipliziert, also mit 1,68. Ebenso wurde die Extinktion von Cholesterinpalmitat mit dem Molekular-

gewicht von Cholesterinpalmitat dividiert durch das Molekulargewicht von Cholesterin multipliziert, also mit 1,61. Die Cholesterinester wurden käuflich erworben und in ihrer Reinheit nicht näher untersucht.

I, II, III bezeichnen die drei gemachten Einwaagen.

Cholesterin p.a. Merck							
	10	20	30	40	50	60	70 gamma Chol.
Ext.	128	238	332	439	546	578	597×10^{-3}
I	131	243	335	477	546	569	610
II	131	237	331	441	528	577	624
	135	243	333	443	532	585	619
III	133	240	328	430	536	557	616
	132	241	334	436	527	568	622
$\bar{x}$	132	240	332	439	536	572	615

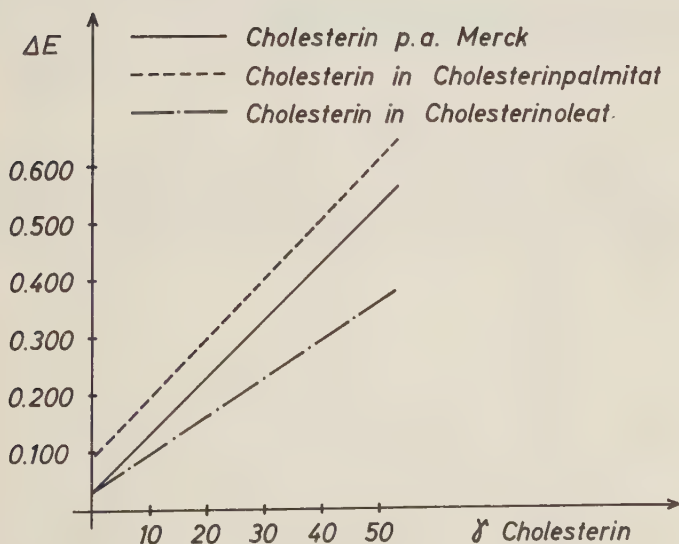
Cholesterin in Cholesterinoleat							
	10	20	30	40	50	60	70 gamma Chol.
Ext.	104	172	232	300	355	365	359×10^{-3}
I	106	168	224	291	349	382	350
II	111	162	214	271	332	365	359
	111	160	217	271	334	372	350
III	109	170	224	288	364	365	349
	116	172	229	283	359	376	352
$\bar{x}$	109	167	223	284	348	370	353

Cholesterin in Cholesterinpalmitat

	10	20	30	40	50	60	70 gamma Chol.
Ext.	191	310	391	514	628	513	487×10^{-3}
I	199	317	403	508	616	529	487
II	194	304	416	495	628	552	451
	189	312	409	508	613	547	466
III	195	296	391	492	595	535	448
	200	307	401	503	589	545	472
$\bar{x}$	194	307	401	503	611	536	468

Abb. 4

Vergleich der Farbbildung nach
SEARCY BERGQUIST mit Cholesterin p.a. Merck,
Cholesterinoleat und Cholesterinpalmitat.



Die drei Geraden der obigen Zeichnung stellen Regressionsgeraden dar. Die Berechnung und Zeichnung geht nur bis 50 gamma Cholesterin, da die höheren Konzentrationen von Cholesterin in Cholesterinoleat und -palmitat keine Linearität zeigen.

$$y = a + b \cdot x$$

Cholesterin p.a. Merck

$$b = 1,00 = 45^\circ$$

$$a = 0,030$$

$$y = 0,030 + 0,010 \cdot x$$

Cholesterin in Cholesterinoleat

$$b = 0,68 = 34^\circ$$

$$a = 0,030$$

$$y = 0,030 + 0,0068 \cdot x$$

Cholesterin in Cholesterinpalmitat

$$b = 1,04 = 46^\circ$$

$$a = 0,090$$

$$y = 0,09 + 0,010 \cdot x$$

Die Zunahme der Intensität der Farbreaktion mit steigender Konzentration ist bei Cholesterin p.a. Merck (Steigung der Regressionsgeraden = 45°) gleich der bei Cholesterin in Cholesterinpalmitat (Steigung der Regressionsgeraden = 46°). Schwächer ist die Zunahme der Intensität der Farbreaktion bei Cholesterin in Cholesterinoleat (Steigung der Regressionsgeraden = 34°).

3) Wiederholbarkeit = Praezision in der Serie

a) reines Cholesterin p.a. Merck

Es wurde die Wiederholbarkeit für niedere, mittlere und höhere Konzentrationen ermittelt. Bestimmt wurde sie für 20, 40, 60, 80 gamma Cholesterin. Es wurde jeweils eine zehnfache Bestimmung durchgeführt.

	20	40	60	80 gamma Cholesterin
Extinktion	201	401	543	650×10^{-3}
	200	401	544	649
	205	399	542	650
	199	396	547	641
	201	402	543	643
	197	403	546	640
	199	408	544	645
	198	400	541	654
	203	401	542	644
	200	404	545	646
Σ	2003	4015	5437	6462
$\bar{x}$	200	402	544	646
σ	2,38	3,12	2,02	4,34
σ_M	0,75	0,98	0,64	1,37
VK%	1,19	0,77	0,37	0,67 %

Die Praezision in der Serie wird mit steigender Konzentration von Cholesterin zunächst besser um bei hoher Konzentration (80 γ Cholesterin) schlechter zu werden.

- b) Wiederholbarkeit = Praezision in der Serie für Cholesterin im Serum
In einem Serum wurden sämtliche Schritte der Bestimmung 10mal durchgeführt.

Die Werte stellen Cholesterin in mg% dar.

Gesamtcholesterin in mg%	freies Cholesterin in mg%
224	60
224	62
221	62
216	62
224	63
215	60
214	64
221	59
226	63
225	64

	Gesamtchol.	freies Cholest.
Mittelwert $\bar{x}$ in mg%	221	62
Standardabweichung σ	4,45	1,73
Standardabweichung des Mittelwertes $\bar{x}$ σ_M	1,40	0,54
Variationskoeffizient VK	2,01 %	2,79 %

Die Praezision in der Serie für Cholesterin im Serum ist für Gesamtcholesterin besser als für freies Cholesterin.

- c) Wiederholbarkeit = Praezision in der Serie für den Leerwert und Empfindlichkeit der Methode
Der Leerwert wurde 12mal bestimmt.

19, 12, 13, 15, 12, 21, 16, 13, 15, 11, 13, 14

Mittelwert $\bar{x} = 14,5$

Standardabweichung $\sigma = 3,01$

Standardabweichung des Mittelwerts $\sigma_M = 0,78$

Die Empfindlichkeit der Methode entspricht der doppelten Standardabweichung des mittleren Leerwerts $6,02 \hat{=} 5,32$ mg%, ist also gut.

- 4) Reproduzierbarkeit von Standardlösungen = Praezision von Tag zu Tag

- a) reines Cholesterin p.a. Merck

Die Menge von 20 gamma Cholesterin wurde über 5 Monate bestimmt.

Die Werte stellen die Extinktionen dar.

248	234	210	209	234
226	214	203	232	245
249	234	230	233	231
229	198	204	202	202
227	237	208	199	246
251	235	233	222	224
234	225	242		

Mittelwert der Extinktionen $\bar{x} = 226 \hat{=} 200$ mg%

Standardabweichung $\sigma = 15,83 \hat{=} 14$ mg%

Standardabweichung des Mittelwerts $\sigma_M = 2,39 \hat{=} 2,11$ mg%

Variationskoeffizient VK = 7,07 %

Die Reproduzierbarkeit = Praezision von Tag zu Tag für Standardlösungen ist gut und zeigt einen Variationskoeffizienten von 7,07 %.

- b) Reproduzierbarkeit = Präzision von Tag zu Tag für den Leerwert und Empfindlichkeit der Methode

Der Leerwert wurde über 5 Monate bestimmt. Die Werte stellen die Extinktionen dar.

20, 8, 16, 17, 24, 13, 20, 15, 12, 17, 16, 21, 18, 18, 16, 8, 18, 20, 19, 17, 20, 18, 10.

Mittelwert $\bar{x} = 14,5$

Standardabweichung $\sigma = 3,01$

Standardabweichung des Mittelwerts $\sigma_M = 0,87$

Die Empfindlichkeit der Methode, das bedeutet die doppelte Standardabweichung des Leerwerts beträgt hier $6,02 \hat{=} 5,32 \text{ mg}\%$, ist also gut.

III. Bestimmung des Gesamtcholesterin nach WATSON¹²⁾

A) BESPRECHUNG DER METHODE

Die Durchführung der beiden bisher beschriebenen Methoden ist technisch umständlich und zeitraubend. Sie benötigen mehrere Transfers des Materials und erfordern viele Schritte, wie z.B. Pipettierungen, Verseifung, Fällung und Waschung.

Bei der Methode nach WATSON¹²⁾, die nach einer Anleitung von RICHTERICH und LAUBER⁵⁾ durchgeführt wurde, wird wie bei der Methode nach SCHÖNHEIMER und SPERRY⁷⁾ die LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion angesetzt, wobei bei Behandlung von Cholesterin mit Essigsäureanhydrid und konz. Schwefelsäure in wasserfreiem Milieu polymere ungesättigte Kohlenwasserstoffe mit intensiver blaugrüner Farbe entstehen. Sie sind über 99 % auf Cholesterin zurückzuführen.

Nach Ansicht von RICHTERICH und LAUBER ist eine wesentliche Verbesserung der Zuverlässigkeit der LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion zu erwarten, wenn es gelingt die folgenden Abänderungen vorzunehmen.

- 1) Bessere Kontrolle der Erwärmung.
- 2) Verminderung der Zahl der Manipulationen und Eliminierung von Transfers.
- 3) Umgehung der Extraktion durch direkte Bestimmung im Serum.
- 4) Durchführung der Farbreaktion in Essigsäureanhydridextrakten und nicht in Extrakten mit Chloroform oder Alkoholen.

1953 beschrieben PEARSON, STERN und McGAVACK⁴⁾ eine rasche und einfache Methode. Sie fügen dem Serum direkt Eisessig, p-Toluol-Sulfosäure, Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure zu. Das Essigsäureanhydrid extrahiert das Cholesterin, präzipitiert das Eiweiß und garantiert ein wasserfreies Milieu. Der Zusatz von p-Toluol-Sulfosäure dispergiert die Eiweiße. Da bereits bei diesem ersten Schritt durch die Dehydratisierung und Dispergierung des Eiweißes Wärme entwickelt wird, vermindert sich entsprechend die beim Schwefelsäurezusatz auftretende Erhitzung. Die Fehlerquelle der inkonstanten Erwärmung wird dadurch vermindert. Obwohl die Farbintensität bei 620 - 650 nm am größten ist, wird bei 560 bis 590 nm gemessen, da hier die Farbe stabiler ist. RICHTERICH und LAUBER verwenden an Stelle von p-Toluol-Sulfosäure 2, 5 Dimethyl-Benzol-

Sulfosäure.

Stark hämolytische und ikterische Seren führen zu falschen, zu hohen Werten.

RICHTERICH und LAUBER⁵⁾ lehnen sich eng an WATSON¹²⁾ in ihrer Methode an.

B) DURCHFÜHRUNG DER METHODE

Reagentien:

- | | |
|--------------------------------|--|
| 1) Cholesterin-Standard-Lösung | 400 mg getrocknetes Cholesterin sind in 100 ml Eisessig gelöst |
| 2) Cholesterin Reagenz | Essigsäureanhydrid und Eisessig im Verhältnis 3 : 2, als Lösungsvermittler dient 1/20 molare p-Xylol-sulfonsäurelösung |

3) Konz. Schwefelsäure

1) und 2) wurden als gebrauchsfertige Lösungen von der Firma Haury München bezogen.

Die Methode wurde hier in Anlehnung an SITZMANN¹⁰⁾ durchgeführt.

Für jede Analyse wird ein Standard und Reagentienleerwert angesetzt. Die Reagenzgläschen (Mikroreagenzgefäße aus Plastik mit einem Fassungsvermögen von 1,8 ml) stehen in einem Wasserbad von 25°.

a) Analysenansatz:

In ein Reagenzgläschen werden 0,02 ml Serum gegeben und 1,0 ml Cholesterinreagenz. Man wartet 10 min bis das Gemisch sich abgekühlt hat und gibt 0,2 ml konz. Schwefelsäure zu. Nach 15 min wird gegen Aqua bidest. bei einer Wellenlänge von 560 - 570 nm in einem Photometer abgelesen. Man erhält den Extinktionswert für die Analyse E (A).

b) Standardansatz:

In ein Gläschen werden 0,02 ml Standardreagenz gegeben und 1,0 ml Cholesterinreagenz. Nach 10 min wird 0,2 ml konz. Schwefelsäure zugesetzt und wie unter a) abgelesen. Man erhält den Extinktionswert des Standards E(S).

c) Reagentienleerwert:

In ein Reagenzgläschen werden 0,02 ml Aqua dest. und 1,0 ml Cholesterinreagenz gegeben. Nach 10 min wird wieder 0,2 ml konz. Schwefelsäure zu-

gesetzt und wie unter a) abgelesen. Man bekommt den Extinktionswert des Leerwerts E (L).

Bei allen drei Ansätzen ist es wichtig, daß die Reagenzgläschen im Wasserbad bei 25° stehen und nach Zugabe von der konz. Schwefelsäure das sich bildende Präzipitat solange geschüttelt wird, bis es sich gelöst hat.

Eine Tabelle faßt die Arbeitsvorschrift zusammen.

Die Ablesung erfolgte im Photometer von Zeiss (Elko III) mit dem Filter S 57E. Es wurden Halbmikrokuvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet.

	Analyse	Reagentien Leerwert	Standard
Cholesterin reagenz	1,0	1,0	1,0
Aqua dest.		0,02	
Serum	0,02		
Standardlösung			0,02
10 min abkühlen lassen. Danach die Reagenzgläschen in ein Wasserbad von 25° stellen. Danach Zugabe von			
konz. Schwefel- säure	0,2	0,2	0,2
nach 15 min aus dem Wasserbad nehmen und bei 560 - 570 mμ gegen Aqua dest. messen.			

Berechnung:

Sie erfolgt nach der Formel

$$\frac{E(A)}{E(S)} - \frac{E(L)}{E(L)} \times 400 = \text{mg\% Gesamtcholesterin}$$

Der Faktor 400 kommt dadurch zustande, daß das Standardreagenz auf 400 mg% Cholesterin eingestellt ist.

C) PRÜFUNG DER METHODE

1) Linearität der Farbreaktion

Aus der Cholesterin-Standardlösung der Firma Haury München wurden 20 bis 80 gamma Cholesterin eingesetzt. Es wurde jeweils eine Zehnfachbestimmung durchgeführt.

	20	40	60	80 gamma Cholesterin
Extinktion	37	120	189	247×10^{-3}
	35	125	191	246
	40	121	178	242
	39	124	176	246
	39	125	171	243
	44	126	176	246
	38	126	187	242
	42	126	187	241
	40	126	184	240
	42	128	177	237
Σ	396	1247	1816	2430
$\bar{x}$	40	125	182	243
σ	2,66	2,47	6,99	3,23
σ_M	0,84	0,78	2,21	1,04
VK%	6,65	1,97	3,84	1,32 %

Die Praezision in der Serie für Standardlösungen ist bei niedriger Cholesterinkonzentration (20 γ Cholesterin) viel schlechter als bei hoher Konzentration (80 γ Cholesterin).

2) Wiederholbarkeit = Praezision in der Serie

a) reines Cholesterin p.a.

Hierfür können die obigen Werte genommen werden.

b) Cholesterin im Serum

Ein Serum wurde genommen und 15mal das Gesamtcholesterin bestimmt.

Die Werte stellen Gesamtcholesterin in mg% dar.

188, 194, 216, 200, 216, 206, 216, 188, 206, 194, 216, 200, 216, 194, 206.

Mittelwert $\bar{x}$ in mg%: 204

Standardabweichung $\sigma = 10,78$

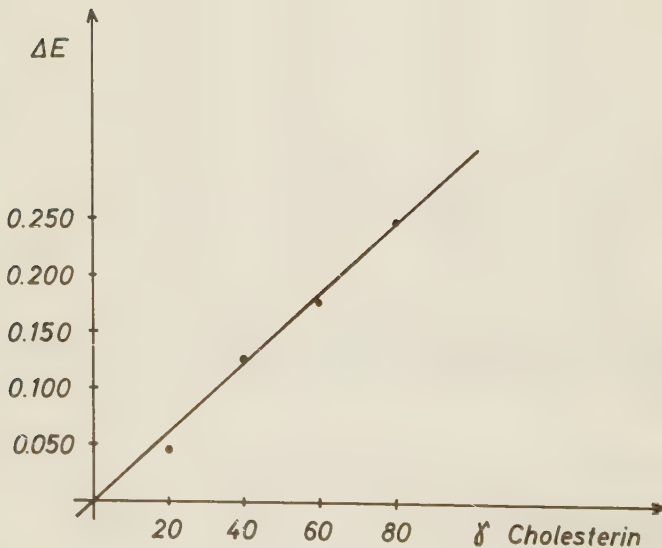
Standardabweichung vom Mittelwert $\sigma_M = 2,78$

Variationskoeffizient VK = 5,28 %

Die Präzision in der Serie für Cholesterin im Serum ist gut. Sie zeigt einen Variationskoeffizienten VK von 5,28 %.

Abb. 5

Linearität der Farbreaktion nach
RICHTERICH LAUBER für Cholesterin p.a. Merck.



- c) Wiederholbarkeit = Präzision in der Serie für den Leerwert und Empfindlichkeit der Methode
Der Leerwert wurde 10 mal bestimmt.

20, 24, 18, 18, 19, 20, 18, 19, 19, 19

Mittelwert $\bar{x} = 19$

Standardabweichung $\sigma = 1,86$

Standardabweichung des Mittelwerts $\sigma_M = 0,57$

Die Empfindlichkeit der Methode entspricht der doppelten Standardabweichung des Leerwerts $3,72 \hat{=} 1,48 \text{ mg\%}$, ist also sehr gut.

IV. Bestimmung des freien Cholesterins nach HOEFLMAYR und FRIED³⁾

A) BESPRECHUNG DER METHODE

Diese Methode hat eine große Ähnlichkeit mit der Gesamtcholesterinbestimmung nach RICHTERICH LAUBER in Anlehnung an WATSON. Es handelt sich um das gleiche Reaktionsprinzip, wobei wiederum eine LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion ausgeführt wird. Aus der Differenz von Gesamtcholesterin nach RICHTERICH LAUBER und des freien Cholesterin nach HOEFLMAYR und FRIED kann das veresterte Cholesterin errechnet werden.

Das Serum wird ohne vorherige Euteiwißung mit einer Digitonin-Isopropylalkohol-Lösung versetzt. Dabei wird zusammen mit dem Eiweiß freies Cholesterin gefällt. Das ausfallende Eiweiß reißt den Cholesterin-Digitoninniederschlag mit. Die Fällung ist nach wenigen Minuten vollständig. Nach Abtrennung des Niederschlags wird mit diesem eine LIEBERMANN-BURCHARD Reaktion ausgeführt. In dem Cholesterinreagenz geht der Niederschlag fast vollständig in Lösung. Das nicht gelöste Eiweiß wird abzentrifugiert.

Die Farbreaktion des Digitonins wird durch Mitführung eines Digitonin-Cholesterin-Standards umgangen. Gemessen wird die Farbe zwischen 560 und 590 m μ aus Gründen der Stabilität. Bei den beiden oben genannten Methoden zur Bestimmung des freien Cholesterins nach SCHÖNHEIMER SPERRY sowie nach SEARCY BERG-QUIST wird zur Entfernung der Cholesterinester der Digitonin-Cholesterinniederschlag mehrmals gewaschen. Hierin kann eine Fehlerquelle liegen. Bei dieser Methode wird diese Schwierigkeit umgangen, indem ein Serumleerwert mitgeführt wird, der in seiner Eiweißfällung den gleichen Anteil Cholesterinester festhält wie die Analyse.

B) DURCHFÜHRUNG

Reagentien:

1) Cholesterinreagenz

1/20 molare Lösung von 2,5 Dimethyl-Benzol-Sulfonsäure in 300 ml Essigsäureanhydrid und 200 ml Eisessig.

2) Digitonin-Cholesterin-Standard 200 mg% (Bezogen auf Cholesterin) 200 mg Cholesterin und 888 mg krist. Digitonin werden in 80 ml Eisessig unter Erwärmen gelöst. Die Lösung wird längere Zeit zum Sieden erhitzt und dann in einen 100 ml Meßkolben quantitativ überführt und mit Eisessig zur Marke aufgefüllt.

3) Digitonin-Isopropyl-Lösung 0,25 %

4) Isopropylalkohol (wasserfrei)

5) konz. Schwefelsäure

1), 2) und 3) wurden als gebrauchsfertige Lösungen von der Firma Haury München bezogen.

a) Analysenansatz:

In ein Zentrifugenglas gibt man 0,05 ml Serum und 1,0 ml Digitonin-Isopropylalkohol. Nach 1^h (um vollständig zu fällen wurde 1 Stunde gewartet und nicht 10 min wie HOEFLMAYR FRIED angeben) wird der Niederschlag scharf abzentrifugiert. Der klare Überstand wird verworfen. Nun wird 2,5 ml Cholesterinreagenz zugesetzt und der Niederschlag gut aufgewirbelt und dann abzentrifugiert. Der Überstand kommt in ein trockenes Reagenzglas und wird mit 0,5 ml konz. Schwefelsäure versetzt, wobei das Reagenzglas in einem Wasserbad von 25° steht. Die entstehende Farbe wird nach 15 min bei 560 - 590 m μ gegen Aqua dest. abgelesen.

b) Serumleerwertansatz:

In ein Zentrifugenglas wird 0,05 ml Serum und 1,0 ml Isopropylalkohol gegeben. Nach dem Abzentrifugieren wird der klare Überstand verworfen und zum Niederschlag 2,5 ml Cholesterinreagenz zugesetzt. Darauf wird gut aufgewirbelt und erneut abzentrifugiert. Der Überstand kommt in ein trockenes Reagenzglas und wird mit 0,5 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Das Reagenzglas steht dabei in einem Wasserbad von 25°. Die Ablesung der Farbe erfolgt wie unter a).

c) Standardansatz:

In ein Reagenzglas wird 0,05 ml Digitonin-Cholesterin-Standard und 2,5 ml Cholesterinreagenz gegeben. Im Wasserbad von 25° wird 0,5 ml konz. Schwefelsäure zugegeben und nach 15 min wie unter a) abgelesen.

d) Leerwertansatz:

In ein Reagenzglas gibt man 0,05 ml Digitonin-Lösung 0,25 % und 2,5 ml Cholesterinreagenz. Im Wasserbad von 25° wird 0,5 ml konz. Schwefelsäure zugesetzt und wie unter a) im Photometer gemessen.

Eine Tabelle, die der Anleitung der Firma Haury entnommen wurde, faßt die Arbeitsvorschrift zusammen.

Analyse und Serumleerwert werden in Zentrifugengläsern angesetzt.

	Analyse	Serumleerwert
Isopropylalkohol	---	1,0
Digitoninlösung 0,25 %	1,0	---
Serum	0,05	0,05

10 min stehenlassen (bei dieser Arbeit wurde 1^h stehengelassen) und dann scharf abzentrifugieren. Der klare Überstand wird verworfen.

	Analyse	Serum Leerwert	Standard	Leerwert
Rückstand, feucht	+	+	-	-
Digitonin-Cholest. Standard	-	-	0,05	-
Digitonin-Lösung 0,25 %	-	-	-	0,05
Cholesterinreagenz	2,5	2,5	2,5	2,5

Der Niederschlag wird bei der Analyse und beim Serumleerwert gut aufgewirbelt und dann abzentrifugiert. Der klare Überstand wird vollständig in trockene Reagenzgläser abgegossen und weiterverwendet.

Schwefelsäure konz.	0,5	0,5	0,5	0,5
---------------------	-----	-----	-----	-----

Die Extinktionen werden nach 15 min gemessen gegen Aqua dest. Die Ablesung erfolgte im Photometer Zeiss Elko III mit dem Filter S 57E. Es wurden Halbmikrokuvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet.

e) Berechnung:

Sie erfolgt nach der Formel

$$\frac{E(A) - E(SL)}{E(S)} \times 200 = \text{mg\% freies Cholesterin}$$

E (A) = Extinktion Analyse minus Extinktion Leerwert

E (SL) = Extinktion Serumleerwert minus Extinktion Leerwert

E (S) = Extinktion Standard minus Extinktion Leerwert

Der Faktor 200 kommt dadurch zustande, daß das Standardreagenz auf 200 mg% Cholesterin eingestellt ist.

C) PRÜFUNG DER METHODE

1) Linearität der Farbreaktion

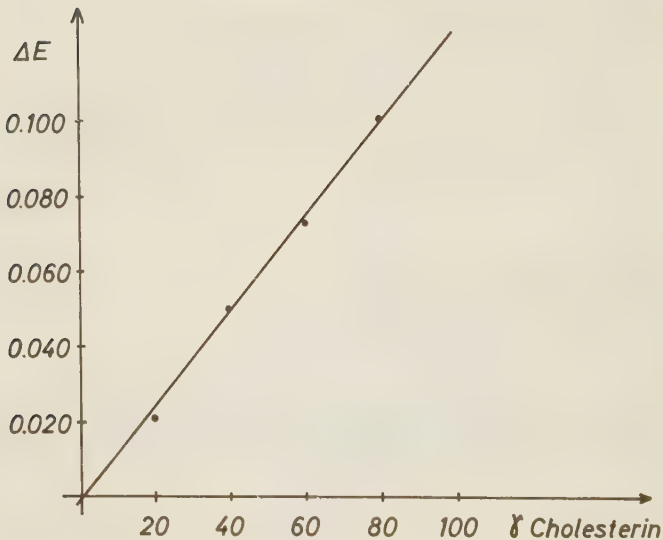
Aus der Cholesterin-Standardablösung der Firma Haury München wurden 20 bis 100 gamma Cholesterin eingesetzt. Es wurde jeweils eine Vierfachbestimmung durchgeführt.

	20	40	60	80	100 gamma Cholesterin
Extinktion	16	56	70	99	132 x 10 ⁻³
	20	53	76	105	127
	22	49	73	96	113
	27	40	76	98	117
Σ	85	198	295	398	489
$\bar{x}$	21	50	73	100	122
σ	4,58	6,97	3,00	3,91	8,77
σ _M	2,29	3,48	1,50	1,95	4,38
VK%	21,8	13,9	4,10	3,91	7,18 %

Die Praezision in der Serie für Standardlösungen wird folglich mit höheren Cholesterinkonzentrationen besser. Bei sehr hohen Cholesterinkonzentrationen (100 γ Cholesterin) wird sie etwas schlechter.

Abb. 6

Linearität der Farbreaktion nach
HOEFELMAYR FRIED für Digitonin-Cholesterinstandard-
lösung-Haury.



2) Wiederholbarkeit = Praezision in der Serie

a) reines Cholesterin

Hierfür können die obigen Werte genommen werden.

b) Cholesterin im Serum

Ein Serum wurde genommen und 13 mal das freie Cholesterin bestimmt.

Die Werte stellen das freie Cholesterin in mg% dar.

92, 84, 70, 62, 77, 85, 92, 77, 84, 70, 62, 77, 70.

Mittelwert $\bar{x}$ in mg%: 77

Standardabweichung: $10,3 = \sigma$

Standardabweichung des Mittelwerts: $\sigma_M = 2,78$

Variationskoeffizient VK = 13,02 %

Die Praezision in der Serie für freies Cholesterin im Serum zeigt einen Variationskoeffizienten VK = 13,02 % ist folglich nicht ganz optimal

- c) Wiederholbarkeit = Praezision in der Serie für den Leerwert und Empfindlichkeit der Methode
Der Leerwert wurde 10 mal bestimmt.

14, 17, 16, 19, 18, 20, 16, 17, 16, 19.

Mittelwert $\bar{x} = 17,2$

Standardabweichung $\sigma = 1,86$

Standardabweichung des Mittelwerts $\sigma_M = 0,57$

Die Empfindlichkeit der Methode entspricht der doppelten Standardabweichung des Leerwerts $3,72 \hat{=} 0,74 \text{ mg\%}$, ist also sehr gut.

V. Vergleichsuntersuchungen der Cholesterinbestimmung mit der Methode nach SCHÖNHEIMER und SPERRY und der Originalmethode nach SEARCY und BERGQUIST

- Richtigkeitsprüfung -

Ein Serum wurde genommen und das Gesamtcholesterin, sowie das freie Cholesterin mit beiden Methoden jeweils 10 mal bestimmt.

1 = SCHÖNHEIMER und SPERRY

2 = SEARCY und BERGQUIST

	Gesamtcholesterin mg%		freies Cholesterin mg%	
	1	2	1	2
	255	244	78	60
	249	224	75	62
	259	221	74	62
	253	216	76	62
	245	224	73	63
	249	215	72	60
	249	214	75	64
	250	221	77	59
	253	226	74	63
	255	225	77	64
Σ	2517	2210	751	619
$\bar{x}$	251	221	75	62
σ	4,01	4,45	1,91	1,73
σ_M	1,26	1,40	0,60	0,54
VK%	1,59	2,01	2,54	2,79 %

Methode 1 liegt beim Gesamtcholesterin im Durchschnitt um 12,3 % höher als Methode 2.

Methode 1 liegt beim freien Cholesterin im Durchschnitt um 17,3 % höher als Methode 2.

Es wurden nun 15 verschiedene Seren genommen und darin sowohl das Gesamtcholesterin als auch das freie Cholesterin bestimmt.

1 = SCHÖNHEIMER und SPERRY

2 = SEARCY und BERGQUIST

Gesamtcholesterin

Methode 1	Methode 2	1 > 2
mg%	mg%	mg%
213	200	13
309	282	27
268	241	27
325	299	26
154	145	9
194	180	14
276	273	3
194	192	2
242	227	15
258	242	16
209	173	27
261	221	40
242	185	57
318	278	40
252	213	39
Σ 3715	3351	355

N = 15

Korrelationskoeffizient $r = 0,9475$

Standardabweichung des Korrelationskoeffizienten $\sigma_r = 0,022830$

$$r = \frac{N \cdot \sum 1 \cdot 2 - \sum 1 \cdot \sum 2}{\sqrt{[N \cdot \sum 1^2 - (\sum 1)^2] [N \cdot \sum 2^2 - (\sum 2)^2]}}$$

$$\sigma_r = \frac{1 - r^2}{\sqrt{N - 2}}$$

- D = Differenz zwischen Einzelwerten
 $\bar{x}_D$ = Mittelwert zwischen den einzelnen Werten
 σ_D = Standardabweichung der Differenz
 $\sigma_{\bar{x}_D}$ = geschätzte Streuung des Mittelwerts der Differenz

$$\sigma_D = \sqrt{\frac{\sum D^2}{N-1} - \frac{(\sum D)^2}{N(N-1)}} \quad \sigma_{\bar{x}_D} = \frac{\sigma_D}{\sqrt{N}}$$

$$\bar{x}_D = \frac{\sum D}{N} \quad t = \frac{\bar{x}_D}{\sigma_{\bar{x}_D}}$$

$$\bar{x}_D = 23,66$$

$$\sigma_D = 15,52$$

$$\sigma_{\bar{x}_D} = 4,00$$

$$t = 5,90$$

$$p < 0,001$$

Darstellung der Regressionsgeraden für Gesamtcholesterin im Serum nach SCHÖNHEIMER SPERRY und SEARCY BERGQUIST!

$$y = a + b \cdot x$$

$$b = 1,022 = 45^\circ$$

$$a = 19$$

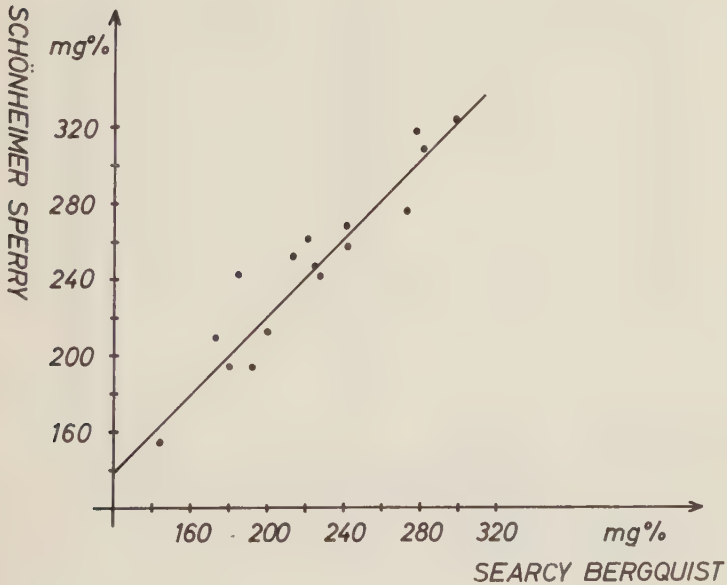
$$y = 19 + 1,022 \cdot x$$

Die Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY) liegt im Durchschnitt um 23 mg% höher als Methode 2 (SEARCY BERGQUIST). Die Differenzen erstreckten sich von 2 bis 57 mg%. Die Unterschiedlichkeit drückt auch der Korrelationskoeffizient aus von 0,9475. Von einer Übereinstimmung zwischen zwei Methoden kann man sprechen wenn der Korrelationskoeffizient mindestens 0,98 beträgt.

Einem Gesamtcholesterinwert von bsp. 200 mg% oder 400 mg% mit der SEARCY BERGQUIST Methode entspricht ein Cholesterinwert von 223 mg% oder 427 mg% mit der SCHÖNHEIMER SPERRY Methode.

Abb. 7

Regressionsgerade für Gesamtcholesterin im Serum
nach SCHÖNHEIMER SPERRY und SEARCY BERGQUIST.



Ebenso wie das Gesamtcholesterin wurde nun in den 15 verschiedenen Seren das freie Cholesterin mit beiden Methoden bestimmt.

1 = SCHÖNHEIMER SPERRY

2 = SEARCY BERGQUIST

Freies Cholesterin

Methode 1 mg%	Methode 2 mg%	1 > 2 mg%
56	56	0
88	75	13
99	73	26
98	81	17
56	52	4
64	52	12
107	83	24
61	58	3
78	71	7
92	84	8
59	52	7
79	73	6
69	62	7
97	79	18
75	73	2
Σ 1178	1024	154

Korrelationskoeffizient $r = 0,9245$

Standardabweichung des Korrelationskoeffizienten $\sigma_r = 0,04030$

Standardabweichung der Differenz $\sigma_D = 7,89$

Geschätzte Streuung des Mittelwerts der Differenz $\sigma_{\bar{x}_D} = 2,03$

t-Test: $t = 5,03$ $p < 0,001$

Die Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY) liegt im Durchschnitt um 10 mg% höher als Methode 2 (SEARCY BERGQUIST). Die Differenzen erstreckten sich von 0 bis 24 mg%. Die Unterschiedlichkeit drückt auch der Korrelationskoeffizient aus von 0,9245.

Regressionsgerade : $y = a + b \cdot x$

$b = 1,33 = 53^\circ$

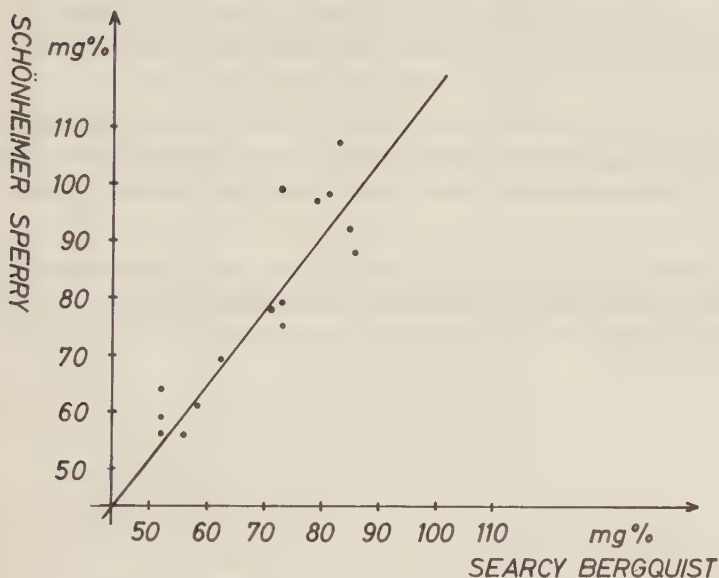
$a = - 11$

$y = 1,33 \cdot x - 11$

Einem Wert für freies Cholesterin von bsp. 60 mg% oder 90 mg% mit der SEARCY BERGQUIST Methode entspricht ein Wert von 69 mg% oder 108 mg% mit der SCHÖNHEIMER SPERRY Methode.

Abb. 8

Regressionsgerade für freies Cholesterin im Serum
nach SCHÖNHEIMER SPERRY und SEARCY BERGQUIST.



Diskussion der Differenzen beider Methoden

Es soll nun untersucht werden, warum die Methode nach SEARCY BERGQUIST niedrigere Werte ergibt sowohl für Gesamtcholesterin, als auch für freies Cholesterin, als die Methode nach SCHÖNHEIMER SPERRY. Es gilt zu klären, ob es an der Farbreaktion oder an der Extraktion liegt, da dieselbe bei der Methode nach SEARCY BERGQUIST einfacher erscheint. Aus diesem Grunde wurde ein Extrakt, der nach der Methode wie sie unter der Cholesterinbestimmungsanleitung nach SCHÖNHEIMER SPERRY dargelegt wurde gewonnen wurde, mit beiden Farbreaktionen versetzt, das heißt nach Methode 1 und 2 bestimmt. Es wurde die Methode nach SEARCY BERGQUIST nochmals etwas abgeändert.

Von dem Extrakt nach Methode 1 (0,2 ml Serum im 5 ml Aethanol-Aether) wird

0,2 ml statt 0,5 ml eingesetzt zur Bestimmung des Gesamtcholesterins, wird auch das freie Cholesterin mitbestimmt, so wird die doppelte Menge eingesetzt, somit 0,4 ml. Die Weiterverarbeitung geschieht in der gleichen Weise wie sie oben bei den beiden Methoden angegeben wurde. Als Testwert wird 0,2 ml von der Testlösung eingesetzt, was 20 gamma Cholesterin entspricht.

Der Faktor errechnet sich aus eingesetzter Testmenge dividiert durch die entsprechende Extinktion minus Leerwert. Zur Umrechnung auf mg/100 ml Serum wird der Faktor mit 12,5 multipliziert und eingesetztes gamma Cholesterin mg Cholesterin gleichgesetzt. Für die Berechnung des freien Cholesterin wird der Faktor halbiert, da die doppelte Menge Extrakt eingesetzt wurde.

Es wurde ein Serum genommen und dann 30 Extrakte nach Methode 1 hergestellt, 15 davon wurden nach SCHÖNHEIMER SPERRY und die anderen 15 nach SEARCY BERGQUIST weiterverarbeitet. Dabei wurde jeweils das Gesamtcholesterin bestimmt.

Es soll mit dieser Versuchsanordnung geklärt werden, ob die Extraktionsmethode nach SEARCY BERGQUIST, die wesentlich einfacher durchzuführen ist als die nach SCHÖNHEIMER SPERRY an den niedrigeren Werten schuld ist.

Bestimmung des Gesamtcholesterin:

Methode 1	Methode 2
mg%	mg%
202	211
204	210
201	200
203	197
195	196
190	203
202	198
198	198
203	194
194	197
186	201
195	207
198	195
197	210
206	202
Σ 2970	3023
$\bar{x}$ 198	202
σ 5,38	5,90
σ_M 1,39	1,52
VK% 2,71	2,92 %

Aus diesem Vergleich ergibt sich, daß beide Farbreaktionen gleiche Werte ergeben und daß die Standardabweichung gleich ist.

Um das eben Gesagte zu bestätigen wurden 15 verschiedene Seren nach Methode 1 extrahiert und aus diesen Extrakten das Gesamtcholesterin nach SCHÖNHEIMER SPERRY und SEARCY BERGQUIST bestimmt.

Gesamtcholesterin

Methode 1	Methode 2	Differenz
mg%	mg%	mg%
245	241	- 4
397	415	+ 18
362	399	+ 37
379	364	- 15
191	197	+ 6
215	199	- 16
230	234	+ 4
206	191	- 15
243	252	+ 9
287	271	- 16
229	230	+ 1
158	161	+ 3
426	423	- 3
272	279	+ 7
332	326	- 6
Σ 4172	4182	+ 10

Korrelationskoeffizient $r = 0,9913 \pm 0,0048$

Standardabweichung des Korrelationskoeffizienten $\sigma_r = 0,00480$

Mittelwert der Differenz zwischen den Werten $\bar{x}_D = 0,66$

Geschätzte Streuung des Mittelwerts der Differenz $\sigma_{\bar{x}_D} = 2,39$

Standardabweichung der Differenz $\sigma_D = 9,26$

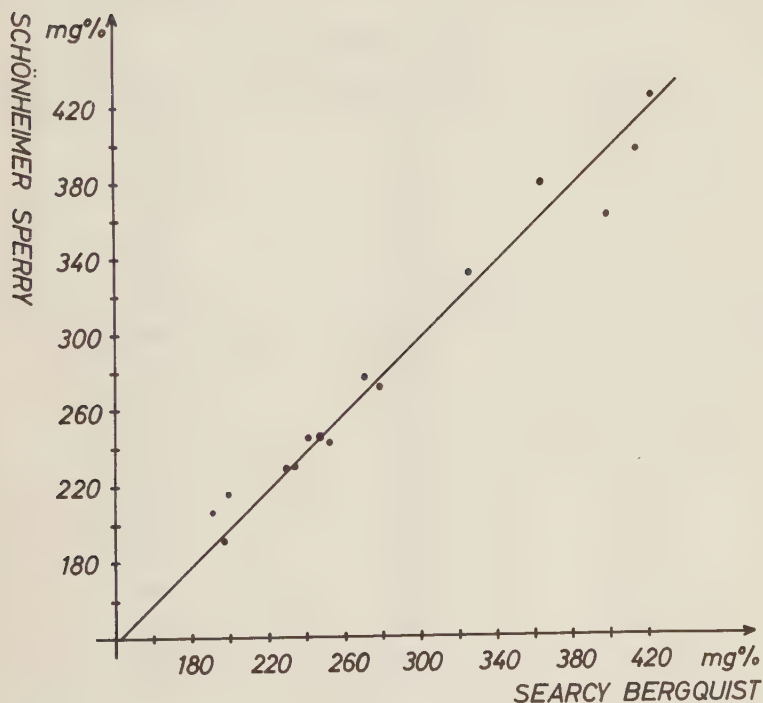
t-Test: $t = 4,45$

$p > 0,05$

Dieser Vergleich zeigt, daß mit einem p von $> 0,05$ zwischen beiden Farbreaktionen kein nennenswerter Unterschied besteht, also bei gleicher Extraktionsmethode, die Methode nach SCHÖNHEIMER SPERRY und die Methode nach SEARCY BERGQUIST gleiche Werte liefern müssen.

Abb. 9

Regressionsgerade für Gesamtcholesterin im Serum
nach SCHÖNHEIMER SPERRY und SEARCY BERGQUIST.
Die Extraktion wurde für beide Methoden nach
SCHÖNHEIMER SPERRY durchgeführt.



$$y = a + b \cdot x$$
$$b = 1,038 = 45^\circ$$

$$a = 10$$
$$y = 1,038 \cdot x - 10$$

Einem Gesamtcholesterinwert von bsp. 250 mg% oder 350 mg% mit der SEARCY BERGQUIST Methode entspricht ein Wert von 249 mg% oder 353 mg% mit der SCHÖNHEIMER SPERRY Methode.

VI. Vergleichsuntersuchung für Gesamtcholesterin mit der Methode nach
SCHÖNHEIMER SPERRY und der Methode nach RICHTERICH LAUBER
- Richtigkeitsprüfung -

Es wurde das Gesamtcholesterin an 17 verschiedenen Seren bestimmt.

1 = SCHÖNHEIMER SPERRY

3 = RICHTERICH LAUBER

Gesamtcholesterin

Methode 1 mg%	Methode 3 mg%	Differenz mg%
218	196	- 22
318	350	+ 32
179	188	+ 9
202	212	+ 10
577	529	- 48
258	269	+ 11
219	236	+ 17
130	175	+ 45
409	406	- 3
336	317	- 19
131	131	0
196	187	- 9
311	302	- 9
432	391	- 41
331	359	+ 28
234	236	+ 2
316	319	+ 3
Σ 4797	4803	+ 6

Korrelationskoeffizient $r = 0,9832 \pm 0,006$

Standardabweichung des Korrelationskoeffizienten $\sigma_r = 0,0060$

Mittelwert der Differenz $\bar{x}_D = 0,35$

Standardabweichung der Differenz $\sigma_D = 15,53$

Geschätzte Streuung des Mittelwerts der Differenz $\sigma_{\bar{x}} = 3,76$

t-Test: $t = 0,093$ $p > 0,05$

Es hat sich gezeigt, daß mit einem $p > 0,05$ zwischen beiden Methoden kein nennenswerter Unterschied besteht, also die SCHÖNHEIMER SPERRY und die RICHTERICH-LAUBER Methode gleiche Werte ergeben.

Darstellung der Regressionsgeraden für Gesamtcholesterin im Serum nach SCHÖNHEIMER SPERRY und WATSON nach RICHTERICH LAUBER.

$$y = a + b \cdot x$$

$$b = 1,10 = 47^\circ$$

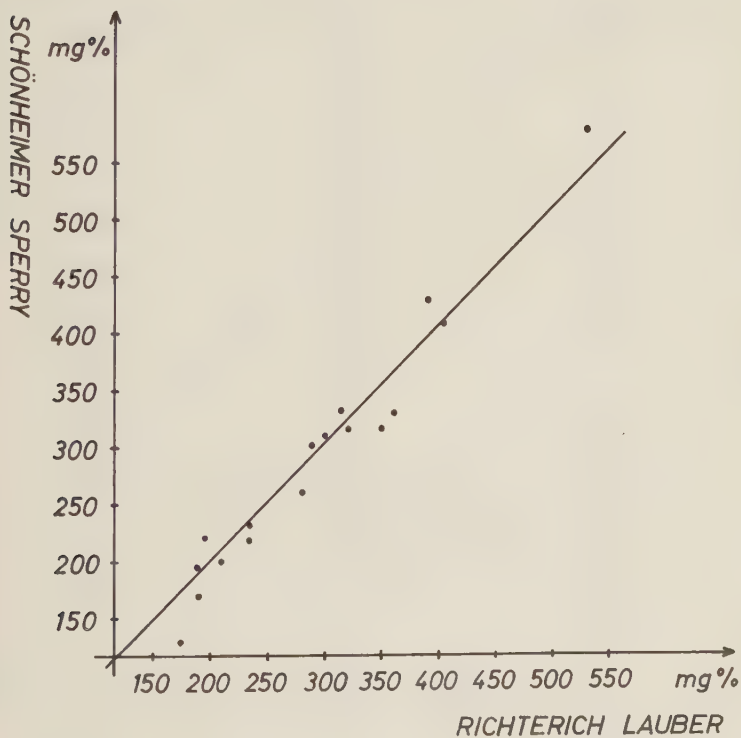
$$a = -28$$

$$y = 1,10 \cdot x - 28$$

Einem Gesamtcholesterinwert von bsp. 200 mg% oder 350 mg% mit der Methode nach RICHTERICH LAUBER entspricht ein Wert von 192 mg% oder 357 mg% mit der Methode nach SCHÖNHEIMER SPERRY.

Abb. 10

Regressionsgerade für Gesamtcholesterin im Serum
nach SCHÖNHEIMER SPERRY und RICHTERICH LAUBER.



VII. Vergleichsuntersuchungen für freies Cholesterin mit der Methode nach
SCHÖNHEIMER SPERRY und der Methode nach HOEFLMAYR FRIED
- Richtigkeitsprüfung -

Es wurde das freie Cholesterin an 20 verschiedenen Seren bestimmt.

Freies Cholesterin

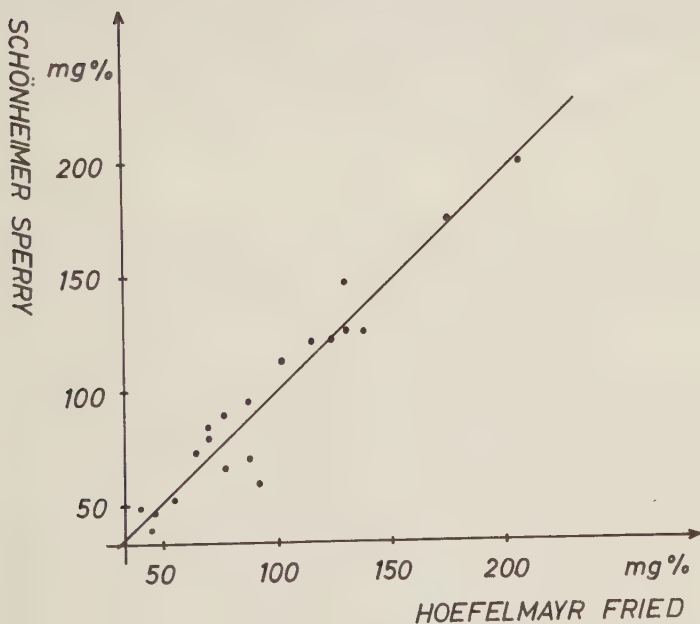
Methode 1 mg%	Methode 4 mg%	Differenz mg%
73	67	- 6
113	101	- 12
48	47	- 1
49	40	- 9
176	184	+ 8
200	207	+ 7
65	77	+ 12
59	92	+ 33
126	138	+ 12
34	46	+ 12
122	115	- 7
96	85	- 11
40	46	+ 6
52	53	+ 1
83	69	- 14
126	138	+ 12
148	131	- 17
89	77	- 12
70	77	+ 7
80	69	- 11
Σ 1849	1859	+ 10

1 = SCHÖNHEIMER SPERRY

4 = HOEFLMAYR FRIED

Abb. 11

Regressionsgerade für freies Cholesterin im Serum
nach SCHÖNHEIMER SPERRY und HOEFELMAYR FRIED.



$$y = a + b \cdot x$$

$$b = 0,97 = 44^\circ$$

$$a = 3$$

$$y = 3 + 0,97 \cdot x$$

Einem Wert für freies Cholesterin von bsp. 70 mg% oder 120 mg% mit der Methode nach HOEFELMAYR FRIED entspricht ein Wert von 71 mg% oder 119 mg% mit der Methode nach SCHÖNHEIMER SPERRY.

Korrelationskoeffizient $r = 0,9821$

Standardabweichung des Korrelationskoeffizienten $\sigma_r = 0,0086$

Mittelwert der Differenz $\bar{x}_D = 0,5$

Standardabweichung der Differenz $\sigma_D = 6,65$

Geschätzte Streuung des Mittelwerts der Differenz $\sigma\bar{x}_D = 1,48$

t-Test: $t = 0,13$ $p > 0,05$

Es hat sich gezeigt, daß mit einem $p > 0,05$ zwischen beiden Methoden kein
nennenswerter Unterschied besteht, die SCHÖNHEIMER-SPERRY Methode und die
Methode nach HOEFLMAYR-FRIED gleiche Werte ergeben.

VIII. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Drei Methoden zur Bestimmung des Gesamtcholesterins und des freien Cholesterins wurden miteinander verglichen. Die Methode 1 war die nach SCHÖNHEIMER und SPERRY⁷⁾, die Methode 2 war die nach SEARCY und BERGQUIST⁸⁾, die Methode 3 war die Bestimmungsmethode des Gesamtcholesterins nach WATSON¹²⁾ in einer Anleitung nach RICHTERICH und LAUBER⁵⁾ und die Methode 4 die Bestimmung des freien Cholesterins nach HOEFLMAYR und FRIED³⁾.

1) Extraktion

Bei Methode 1 (SCHÖNHEIMER-SPERRY) wird das Serum (0,2 ml) im Extraktionsmittel (Aethanol-Aether 2 + 1) im Wasserbad bei 80° zum Sieden gebracht und quantitativ in einen 5 ml Meßkolben überspült. Die Überspülung geschieht durch eine Fritte, dabei wird das Eiweiß zurückgehalten (Seite 6).

Bei Methode 2 (SEARCY BERGQUIST) wird 0,1 ml Serum in Aethanol-Aether (2 + 1) einpipettiert, scharf abzentrifugiert und der Überstand weiterverarbeitet (Seite 18). Dieses Extraktionsverfahren ist wesentlich einfacher als bei Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY), jedoch nicht vollständig, was nun erläutert werden soll. In einem Serum wurde 10 mal mit Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY) und 10 mal mit Methode 2 (SEARCY BERGQUIST) das freie und das gesamte Cholesterin bestimmt (Seite 40). Das Ergebnis war, daß das Gesamtcholesterin im Schnitt 12,3 % bei SCHÖNHEIMER SPERRY höher lag als bei SEARCY BERGQUIST, beim freien Cholesterin waren es 17,3 %. Nimmt man 15 verschiedene Seren so beträgt als Maß der Übereinstimmung der Korrelationskoeffizient zwischen den beiden Methoden 0,9475 für Gesamtcholesterin und 0,9245 für freies Cholesterin (Seite 41). Die Differenz zwischen den Einzelwerten liegt im Mittel bei 23,6 mg% und unterscheidet sich signifikant von Null. Es galt nun zu klären, ob es wirklich an der Extraktion und nicht an der Farbreaktion liegt (Seite 45). Dazu wurde ein Serum 15 mal nach Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY) extrahiert und darauf nach Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY) und Methode 2 (SEARCY BERGQUIST) weiterverarbeitet. Das Resultat war, daß Methode 1 $198 \pm 5,3$ mg% ergab und die veränderte Methode 2 $202 \pm 5,9$ mg% (Seite 47). Diese Übereinstimmung bei gleichem Extraktionsverfahren war auch

bei 15 verschiedenen Seren zu finden (Seite 48). Die Korrelation betrug $r = 0,9913$. Der t-Test ergab, daß kein nennenswerter Unterschied besteht. Damit ist bewiesen, daß die Extraktion bei Methode 2 (SEARCY BERGQUIST) nicht ausreichend ist, was wahrscheinlich auf das Nichterhitzen und mehrmalige Überspülen des Eiweißniederschlags mit dem Extraktionsmittel zurückzuführen ist. Andere Extraktionsmittel außer Aethanol-Aether wurden nicht geprüft, da immer wieder angegeben wurde, daß kein wesentlicher Unterschied besteht¹⁴⁾.

Methode 3 (WATSON nach RICHTERICH LAUBER) wird mit Essigsäureanhydrid extrahiert, aber das Eiweiß nicht abgetrennt, sondern durch 2,5 Dimethyl-Benzol-Sulfosäure in Lösung gehalten (Seite 29). Die Extraktion ist vollständig, da gleiche Werte wie mit Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY) erzielt wurden und die Farbreaktion dieselbe ist (LIEBERMANN-BURCHARD).

2) Aufwand an Zeit und Apparaturen und Ablesung der Farbreaktion

Der Aufwand an Apparaturen, Manipulationen, Pipettierungen und Zeit ist bei Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY) am größten und bei Methode 3 (WATSON nach RICHTERICH LAUBER) am geringsten. Allein die Wartezeit beträgt bei Methode 1 über 4 Stunden, die 8^h Fällungszeit nicht mitgerechnet, da dies meist über Nacht geschah.

Wird mit Methode 2 (SEARCY BERGQUIST) das Gesamtcholesterin bestimmt, so gibt es nur 10 min Wartezeit vor dem Ablesen der Farbe im Photometer, bei Mitbestimmung des freien Cholesterins kommen 8 Stunden Fällungszeit und 2 Stunden zur Trocknung des gewaschenen Niederschlags hinzu.

Bei der Methode 3 (WATSON nach RICHTERICH LAUBER) kommt nur die Wartezeit von 25 min vor, bei Bestimmung des Gesamtcholesterins, ebenso bei Bestimmung des freien Cholesterins nach Methode 4 (HOEFLMAYR FRIED).

Eine Person kann mit Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY) an etwa 30 Seren in drei Tagen das Gesamtcholesterin und das freie Cholesterin bestimmen.

Wird bei Methode 2 (SEARCY BERGQUIST) nur das Gesamtcholesterin bestimmt, so können täglich etwa 20 Seren verarbeitet werden, soll auch das freie Cholesterin mitbestimmt werden, so werden für 25 Seren 2 Tage gebraucht. Die Extraktion wird nach Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY) durchgeführt. Die größte Anzahl an Bestimmungen läßt Methode 3 (WATSON nach RICHTERICH LAUBER) zu, und zwar etwa 30 Seren am Tage, also 2/3 mehr als Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY). Die Farbreaktion wird bei Methode 1 nach Verseifung, Fällung mit Digitonin, Waschung, Trocknung und Lösung in Eisessig durchgeführt. Es handelt sich um eine

LIEBERMANN-BURCHARD Reaktion (Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure). Die Messung im Photometer erfolgt nach 45 min bei 620 m μ .

Bei Methode 2 (SEARCY BERGQUIST) erfolgt die Farbreaktion direkt im Extrakt. Die entstehende Farbe wird nach 10 min bei 490 m μ im Photometer abgelesen. Beide Farben sind stabil, sofern eine Blasenbildung vermieden wird.

Bei Methode 3 (WATSON nach RICHTERICH LAUBER) kommt wieder eine LIEBERMANN-BURCHARD Reaktion zur Anwendung, ebenso bei Methode 4 (HOEFLMAYR FRIED). Die Farbe wird bei einer Wellenlänge von 560 - 590 m μ abgelesen.

3) Linearität der Farbreaktion

Bei Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY) bestand Linearität für Cholesterin p.a. im gemessenen Bereich von 10 bis 80 gamma (Seite 9). Dasselbe gilt für Cholesterin in Cholesterinoleat bzw. -palmitat, allerdings liegen die Werte unter denen für Cholesterin p.a. Merck (Seite 11, 12).

Bei Methode 2 (SEARCY BERGQUIST) ging der lineare Anstieg für Cholesterin p.a. nur bis 40 bis 50 gamma. Von 50 bis 80 gamma Cholesterin war der Anstieg der Extinktion geringer, so daß in diesem Konzentrationsbereich (440 bis 700 mg%) mit niedrigeren Werten zu rechnen ist (Seite 20). Dieses Verhalten war auch festzustellen für Cholesterin in Cholesterinoleat bzw. -palmitat. Es hat sich gezeigt, daß Cholesterin in Cholesterinpalmitat höhere Werte gibt als reines Cholesterin p.a. und Cholesterinoleat niedriger als Cholesterin p.a. (Seite 22, 23).

Bei Methode 3 und 4 war für den gemessenen Bereich für Cholesterin p.a. von 20 - 80 bzw. 20 - 100 gamma die Linearität der Farbreaktion ausgeprägt.

4) Wiederholbarkeit = Präzision in der Serie

a) bei Standardlösungen

Sie wurde bei Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY) für 20, 40, 60, 80 gamma Cholesterin p.a. gemessen. Der Variationskoeffizient VK als Ausdruck der Standardabweichung in % des Mittelwerts betrug 2,8 %, 3,1 %, 1,9 %, 0,8 %. Er nahm also mit steigender Konzentration ab (Seite 13, 14).

a') Auch bei Methode 2 (SEARCY BERGQUIST) wurde die Wiederholbarkeit für 20, 40, 60, 80 gamma Cholesterin p.a. gemessen (Seite 24). Der Variationskoeffizient war 1,1 %, 0,7 %, 0,3 %, 0,6 % damit kleiner als bei Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY) und nahm auch wie dort mit

steigender Cholesterinkonzentration ab.

- a'') Bei Methode 3 (WATSON nach RICHTERICH LAUBER) wurde für 20, 40, 60, 80 gamma Cholesterin p. a. ein VK von 6,6 %, 1,9 %, 3 %, 8 %, 1,3 % gemessen (Seite 31).
- a''') Bei Methode 4 (HOEFLMAYR FRIED) wurde für 20, 40, 60, 80 und 100 gamma Cholesterin ein VK von 21,8 %, 4,1 %, 3,9 % und 7,1 % errechnet (Seite 37).
- b) bei Kontrollproben
Die Wiederholbarkeit für Cholesterin im Serum wurde durch Zehnfachbestimmung eines Serums ermittelt. Der Variationskoeffizient für Gesamtcholesterin betrug 1,5 % und für freies Cholesterin 2,5 % (Seite 14), bei Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY).
- b') Im Serum wurde bei Methode 2 (SEARCY BERGQUIST) ein VK für Gesamtcholesterin von 2,0 % und für freies Cholesterin von 2,7 % gefunden (Seite 25), was fast genau gleich ist wie bei Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY).
- b'') Der Variationskoeffizient bei der Methode 3 (RICHTERICH LAUBER) für Gesamtcholesterin im Serum betrug 5,28 (Seite 32) und liegt damit ebenso wie für reines Cholesterin höher als bei Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY) und Methode 2 (SEARCY BERGQUIST).
- b''') Der Variationskoeffizient VK bei Methode 4 (HOEFLMAYR FRIED) für freies Cholesterin im Serum beträgt 13,02 %, ist also nicht optimal.

5) Reproduzierbarkeit = Praezision von Tag zu Tag

Die Menge von 50 gamma Cholesterin p. a. wurde über 5 Monate bestimmt, ebenso der Leerwert. Die Standardabweichung für Cholesterin betrug 11,4 mg%, der Variationskoeffizient VK = 4,42 % bei Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY). Für den Leerwert wurde eine Standardabweichung von 2,5 mg% ermittelt (Seite 15, 16). Bei Methode 2 (SEARCY BERGQUIST) wurde eine Cholesterinmenge von 20 gamma über 5 Monate bestimmt. Die Standardabweichung war mit 14 mg% höher als bei Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY), der Variationskoeffizient VK = 7,0 % ebenfalls höher als bei Methode 1 (Seite 26, 27). Die Standardabweichung des Leerwerts war 2,6 mg%, also gleich wie bei Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY).

6) Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit, die der doppelten Standardabweichung des Leerwerts entspricht betrug für Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY, Seite 16) 5,1 mg%, für

Methode 2 (SEARCY BERGQUIST, Seite 27) 5,3 mg%, für Methode 3 (WATSON nach RICHTERICH LAUBER, Seite 33) 1,4 mg% und für Methode 4 (HOEFLMAYR FRIED, Seite 39) 0,7 mg%.

7) Vergleich der vier Methoden

Als Maß der Übereinstimmung wurde der Korrelationskoeffizient r errechnet.

Er betrug für 15 verschiedene Seren zwischen Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY) und Methode 2 (SEARCY BERGQUIST) 0,9575 beim Gesamtcholesterin und 0,9245 beim freien Cholesterin (Seite 42). Die Differenz unterscheidet sich signifikant von Null. Die Differenz zwischen den Einzelwerten betrug im Mittel 23 mg%. Bei Verwendung derselben Extraktionsmethode nach SCHÖNHEIMER SPERRY für beide Farbreaktionen ergaben 15 verschiedene Seren ein r von 0,9913, also Übereinstimmung, da von Übereinstimmung bei einem r von mindestens 0,98 gesprochen werden kann (Seite 48). Ein p von $> 0,05$ zeigte, daß kein nennenswerter Unterschied besteht. Die Differenz der Einzelwerte war im Mittel 0,7 mg%.

Auch Methode 3 (WATSON nach RICHTERICH LAUBER) ergab mit Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY) Übereinstimmung. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,9832, wobei 17 verschiedene Seren bestimmt wurden. Das p von $> 0,05$ zeigte auch hier, daß kein nennenswerter Unterschied besteht. Die Differenz der Einzelwerte betrug im Mittel 0,35 mg% (Seite 52).

Übereinstimmung zeigten auch Methode 1 (SCHÖNHEIMER SPERRY) und Methode 4 (HOEFLMAYR FRIED) bei Bestimmung des freien Cholesterins an 20 verschiedenen Seren. Der Korrelationskoeffizient r betrug 0,9821, p war $> 0,05$. Der Mittelwert der Differenz war 0,5 mg% (Seite 56).

IX. Bestimmung von Normalwerten für Gesamtcholesterin und freies Cholesterin.

In den letzten Jahrzehnten wurden viele Untersuchungen über den normalen Cholesterinspiegel durchgeführt. Die Werte variieren beträchtlich. Dieser Mangel an Übereinstimmung dürfte wie SEARCY, GIDDINGS und BERGQUIST⁹⁾ berichten auf die Vernachlässigung gewisser physiologischer Gegebenheiten durch Umwelteinflüsse wie auf einer Anzahl technischer Faktoren beruhen. Die wichtigsten physiologischen Einflüsse, die häufig vernachlässigt werden sind diejenigen des Geschlechts und Alters.

In dieser Arbeit wurden Normalwerte bestimmt und zwar wurde nach Geschlecht und Alter in vier Gruppen aufgeteilt. Frauen im Alter von 20 bis 30 Jahren und 30 bis 40 Jahren und Männer im Alter von 20 bis 30 und 30 bis 40 Jahren.

Die Bestimmung erfolgte nach der Methode nach SCHÖNHEIMER SPERRY. Das veresterte Cholesterin wurde aus der Differenz von Gesamtcholesterin und freiem Cholesterin errechnet.

Die Abnahme des Blutes erfolgte morgens, und zwar nüchtern. Außerdem wurde den Probanden auferlegt am vorausgehenden Abend wenig und fettarm zu essen. Die Personen waren gesund und ohne irgendwelche Beschwerden, die auf eine versteckte Krankheit hinweisen könnten.

A) Frauen im Alter von 20 - 30 Jahren

	Gesamtchol. mg%	Esterchol. mg%	freies Chol. mg%	% Anteil des Esters
	171	123	48	72
	152	103	49	68
	161	109	52	68
	180	119	61	66
	222	151	71	68
	227	152	75	67
	155	104	51	67
	221	157	64	71
	162	117	45	72
	172	120	52	70
	237	162	75	71
	207	141	66	68
	147	91	56	62
	156	103	53	66
	217	148	69	67
	223	150	83	67
Σ	3010	2050	970	1091
$\bar{x}$	188	128	61	68
σ	32,35	23,09	11,53	2,59
σ_M	8,08	5,77	2,88	0,64
VK%	17,20	18,03	18,90	3,80 %

Gesamtcholesterin: 188 mg% $\pm$ 32 mg%

Estercholesterin: 128 mg% $\pm$ 23 mg%

freies Cholesterin: 61 mg% $\pm$ 11 mg%

% des Esters: 68 % $\pm$ 2,5 %

B) Frauen im Alter von 30 - 40 Jahren

	Gesamtchol. mg%	Esterchol. mg%	freies Chol. mg%	% Anteil des Esters
	130	91	39	70
	175	117	58	67
	174	122	52	70
	154	93	51	64
	224	148	76	66
	189	127	62	67
	186	108	78	58
	201	131	70	65
	178	116	62	66
	262	176	86	67
	254	179	75	70
Σ	2127	1408	709	730
$\bar{x}$	193	128	64	66
σ	39,95	29,34	14,01	3,46
σ_M	13,32	9,78	4,67	1,15
VK%	20,69	22,92	21,98	5,24 %

Gesamtcholesterin: 193 ± 39 mg%

Estercholesterin: 128 ± 29 mg%

freies Cholesterin: 64 ± 14 mg%

% Anteil des Esters: $66 \pm 3,4$ %

C) Männer im Alter von 20 - 30 Jahren

Gesamtchol.	Esterchol.	freies Chol.	% Anteil
mg%	mg%	mg%	des Esters
174	112	62	65
207	147	60	71
201	132	69	66
248	178	70	72
235	154	81	66
230	155	75	67
199	138	61	69
225	163	62	72
210	146	64	70
228	162	66	71
259	172	87	67
242	164	78	68

Σ	2658	1823	835	824
$\bar{x}$	222	152	69	69
σ	24,05	18,36	8,85	2,52
σ_M	6,94	5,30	2,55	0,72
VK%	10,83	12,07	12,82	3,65%

Gesamtcholesterin: 222 ± 24 mg%

Estercholesterin: 152 ± 18 mg%

freies Cholesterin: 69 ± 8 mg%

% des Esteranteils: $69 \pm 2,5$ %

D) Männer im Alter von 30 - 40 Jahren

	Gesamtchol. mg%	Esterchol. mg%	freies Chol. mg%	% Anteil des Esters
	180	124	56	69
	181	125	56	69
	255	167	88	66
	195	116	79	60
	209	152	57	73
	220	146	74	66
	241	163	78	68
	200	130	70	65
	243	146	97	59
	192	118	74	61
	162	107	55	66
	176	112	64	64
	275	185	90	67
	287	189	98	66
Σ	3016	1980	1036	919
$\bar{x}$	215	141	74	66
σ	39,00	27,18	15,22	3,79
σ_M	10,42	7,43	4,06	1,01
VK%	18,13	19,27	20,56	5,74 %

Gesamtcholesterin: 215 ± 39 mg%

Estercholesterin: 141 ± 27 mg%

freies Cholesterin: 74 ± 15 mg%

% Anteil des Esters: $66 \pm 3,7$ %

Bestimmung von Normalwerten bei 53 Personen
mit der Methode nach SCHÖNHEIMER SPERRY

	Gesamtcholesterin mg %	freies Cholesterin mg %
Frauen 20 - 30	188 ± 32	61 ± 11
Frauen 30 - 40	193 ± 39	64 ± 14
Männer 20 - 30	222 ± 24	69 ± 8
Männer 30 - 40	215 ± 39	74 ± 15

Diese Tabelle zeigt, daß zwischen den Altersgruppen von 20 - 30 und 30 - 40 Jahren sowohl beim Gesamtcholesterin als auch beim freien Cholesterin kein nennenswerter Unterschied besteht. Die Männer liegen insgesamt etwas höher als die Frauen.

Die folgende Zusammenstellung, die aus Arbeiten von EGGSTEIN²⁾, SEARCY BERGQUIST⁸⁾ und ZÖLLNER¹⁶⁾ entnommen wurde mag zeigen zu welchen verschiedenen Werten die einzelnen Untersucher gekommen sind. Es wurden außerdem in diese Tabelle noch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse eingetragen.

Gesamtchol. mg%	freies Cholest. mg%	
162	47	E.M. BOYD 1933
232 ± 62	82 ± 17	H.J. PAGE 1935
219 ± 47	57,5 ± 15	v. KOMERUP 1950
152 ± 24	46 ± 8	E.M. BOYD 1937
150 - 260	30 - 35	THANNHAUSER 1950
194 ± 12	58 ± 6	A.L. FRÖHLICH 1951
194 ± 36		E.B. MAN 1956
205	79	E. BÖHLE 1958
176 ± 27,8		EGGSTEIN 17 - 25 Jahre 1956
209 ± 29,1		EGGSTEIN 46 - 70 Jahre 1965
177 (88-354)		SEARCY BERGQUIST
100 - 250		MERTENS und ALBERS
150 - 350	53 (18-154)	SCHÖNHEIMER SPERRY
		ZÖLLNER 1965
		Mitteleuropäische Kost
125 - 213 - 305		Männer 25 - 29
148 - 242 - 336		Männer 40 - 59
		fettarme Kost
125 - 209 - 293		Männer 40 - 59
		Ergebnis dieser Arbeit
188 ± 32	61 ± 11	1965 Frauen 20 - 30
193 ± 39	64 ± 14	1965 Frauen 30 - 40
222 ± 24	69 ± 8	1965 Männer 20 - 30
215 ± 39	74 ± 15	1965 Männer 30 - 40

X. ZUSAMMENFASSUNG

Die drei Cholesterinbestimmungsmethoden nach SCHÖNHEIMER und SPERRY, SEARCY und BERGQUIST, WATSON nach RICHTERICH und LAUBER sowie HOEFLMAYR und FRIED zeigen Übereinstimmung, was in einer straffen Korrelation zum Ausdruck kommt. Der t-Test zeigte, daß kein nennenswerter Unterschied besteht. Dieser Vergleich erhärtet auch die Behauptung, daß weder verseift werden muß noch daß eine indirekte Methode von überlegendem Vorteil ist.

Die einfachste und schnellste Methode ist die nach WATSON bzw. RICHTERICH und LAUBER für Gesamtcholesterin und die nach HOEFLMAYR und FRIED für freies Cholesterin. Sie stellen zweifellos für ein kleines Labor die geeignetsten Methoden dar, wenngleich auch die teuersten, sofern die Reagentien von der Firma Haury München bezogen werden. Von Vorteil ist auch die geringe Serummenge (0,02 ml für Gesamtcholesterin und 0,05 ml für freies Cholesterin). SITZMANN¹⁰⁾ beschreibt, wie das Blut aus dem Ohrläppchen, der Ferse oder Fingerbeere gewonnen werden kann. Werden, wie hier an der Med. Universitätsklinik, noch Fettsäuren und Phosphatide mitbestimmt, so muß doch extrahiert werden und dann kann der Extrakt nach SCHÖNHEIMER und SPERRY oder SEARCY und BERGQUIST weiterverarbeitet werden. Wird nur nach dem Gesamtcholesterin gefragt, was bei Erkrankungen der Schilddrüse, Nieren, Leber Pankreas und der Arteriosklerose vollkommen genügt, so ist die SEARCY BERGQUIST Methode vorzuziehen, da bei ihr die Farbreaktion direkt im Extrakt angesetzt wird.

Was am Anfang dieser Arbeit gesagt wurde, daß jede Methode ihre Vor- und Nachteile hat, wurde wieder einmal bestätigt, außerdem kommt es wie gesagt auch darauf an, was sonst noch für Lipide mitbestimmt werden sollen.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) H. DENNIG
Lehrbuch der Inneren Medizin 6. Auflage Bd. II 147
- 2) M. EGGSTEIN
Klinik der Gegenwart Bd. IX 593 und 595
- 3) J. HOEFLMAYR und R. FRIED
Med. Welt 1964 (2015 - 2017)
- 4) S. PEARSON, S. STERN und T.H. Mc GAVACK
Anal. Chem. 25 (1953) 813
- 5) R. RICHTERICH und K. LAUBER
Klin. Wschr. 40 (1962) 1252
- 6) G. SCHETTLER
Klinik der Gegenwart Bd. IX 573
- 7) R. SCHÖNHEIMER und W.M. SPERRY
Journal of biolog. Chem. 106 (1934) 745
- 8) R.L. SEARCY und L.M. BERGQUIST
Clin. Chim. Acta 5 (1960) 192
- 9) R.L. SEARCY, J.A. GIDDINGS und L.M. BERGQUIST
Ärztliches Laboratorium Heft 8 August 1964
- 10) F.C. SITZMANN
Klin. Wschr. 42 (1964) 1030
- 11) W.M. SPERRY und M. WEBB
Journal of biolog. Chem. 187 (1950) 97
- 12) D. WATSON
Clin. Chim. Acta 5 (1960) 637
- 13) B. ZAK und E. EPSTEIN
Clinical Chem. Vol. 7 No 4 August 1961

- 14) B. ZAK und N. RESSLER
Am. J. Clin. Path. 25 (1955) 433 - 446
- 15) A. ZLATAKIS und B. ZAK
J. Lab. und Clin. Med. 41 (1953) 486 - 492
- 16) N. ZÖLLNER und D. EBERHAGEN
Untersuchung und Bestimmung der Lipoide im Blut (1965) 390

Für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Arbeit sage ich Herrn Privatdozenten Dr. med. Manfred Eggstein meinen herzlichsten Dank.

Herrn Professor Dr. med. Hans Erhard Bock danke ich für die Gewährung des Arbeitsplatzes und für die Überlassung der Apparaturen und Reagentien.

Lebenslauf

Am 14. August 1939 wurde ich, Manfred Beck, als Sohn des Dr. med. Anton Beck und seiner Ehefrau Kreszentia geb. Moll in Ansbach geboren. Ich besuchte das Keplergymnasium in Ulm und anschließend die Oberrealschule in Illertissen (Bayern) und bestand dort 1959 das Abitur.

Das Studium der Medizin begann ich in Tübingen, wo ich das Vorphysikum und das Physikum ablegte. Dann studierte ich je ein Semester in Kiel und Wien. Nach diesen beiden Semestern kehrte ich nach Tübingen zurück und beendete mein Studium mit dem Staatsexamen im Januar 1966.

